

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FABIANE LOIOLA DE OLIVEIRA

Efeito do inibidor de TGF- β , GW-788388, sobre a infecção aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadoras: Dr^a. Mariana Caldas Waghabi

Dr^a. Elen Mello de Souza

RIO DE JANEIRO

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

O482

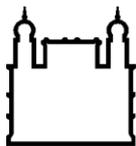
Oliveira, Fabiane Loiola de.

Efeito do inibidor de TGF- β , GW-788388, sobre a infecção aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*. / Fabiane Loiola de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2011.

xiv, 124f. : il. ; 30cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

Bibliografia: f. 81-96



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FABIANE LOIOLA DE OLIVEIRA

Efeito do inibidor de TGF- β , GW-788388, sobre a infecção aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*.

Orientadoras: Dr^a. Mariana Caldas Waghbi

Dr^a. Elen Mello de Souza

Aprovada em: 19/04/2011

EXAMINADORES:

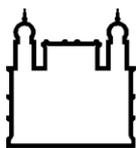
Dra. Andréa Pereira de Souza (IOC/ FIOCRUZ)- Presidente

Dr. Renato Augusto DaMatta (CBB/ UENF)- Titular

Dr. Roberto Saraiva (IPEC/ FIOCRUZ)- Titular

Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro (IOC/ FIOCRUZ)- Revisora e Suplente

Dr. Gabriel Mello de Oliveira (IOC/ FIOCRUZ)- Suplente



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Efeito do inibidor de TGF- β , GW-788388, sobre a infecção aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO

O fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) é uma citocina multifuncional envolvida na modulação de diversos processos celulares, como proliferação celular, formação e degradação de matriz extracelular, tanto em eventos fisiológicos como patológicos. Nosso grupo tem demonstrado o papel regulador de TGF- β na invasão, crescimento e diferenciação do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), o agente etiológico da doença de Chagas, uma importante causa de mortalidade e morbidade em países endêmicos na América latina. Haja vista que o remodelamento da matriz extracelular está diretamente relacionado à extensa fibrose observada no curso da doença de Chagas, nosso objetivo foi avaliar a ação terapêutica de um inibidor da via de sinalização de TGF- β (GW-788388) sobre a infecção aguda experimental pelo *T. cruzi*. Para essa análise foi utilizado o modelo de infecção pelo *T. cruzi* (cepa Y) em camundongos suíços submetidos ao tratamento oral com o composto em diferentes dias pós-infecção (3^o, 13^o e 20^o dpi). Nossos dados revelaram diferentes respostas terapêuticas de acordo com o dia pós-infecção no qual o composto foi administrado. Quando administrado no 3^o dpi, GW-788388 foi capaz de reduzir: (i) o parasitismo tissular e inflamação no coração e fígado; (ii) os níveis plasmáticos de AST, ALT e uréia e; (iii) a deposição de colágeno I e fibronectina no coração dos animais infectados. Neste esquema de tratamento, GW-788388 reverteu ainda a queda na expressão de conexina-43 e os danos de condução elétrica, sugerindo um papel protetor contra os danos cardíaco, hepático e renal, induzidos na infecção por este parasito. Interessantemente, o tratamento no 13^o dpi com GW-788388, apesar de não alterar os parâmetros parasitológicos e clínicos avaliados em relação ao grupo não tratado, aumentou a mortalidade, sugerindo a relevância da via de TGF- β neste período da infecção em que os camundongos estão em choque sistêmico. No entanto, quando a administração do composto foi realizada no 20^o dpi, os resultados revelaram uma significativa diminuição na expressão de colágeno I, indicando a eficiência deste tratamento em promover a degradação dos elementos de matriz no tecido cardíaco infectado. Em resumo, a inibição da via de sinalização de TGF- β reduziu a infecção pelo *T. cruzi*, previniu os danos cardíacos e reverteu a deposição de componentes de matriz extracelular, observados durante esta infecção *in vivo*. O conjunto dos resultados apresentados sugere que o bloqueio da atividade de TGF- β pode representar uma importante intervenção terapêutica a ser investigada em modelos de infecção aguda e crônica pelo *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

TGF- β inhibitor effect, GW-788388, on *Trypanosoma cruzi* experimental acute infection.

ABSTRACT

Transforming growth factor beta (TGF- β) is a multifunctional cytokine involved in modulating many cellular processes such as cell proliferation, formation and degradation of extracellular matrix in physiological and pathological events. Our group has demonstrated the regulatory role of TGF- β in parasite host- cell invasion, growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), the etiologic agent of Chagas disease, an important cause of morbidity and mortality in endemic countries in Latin America. Considering that the extracellular matrix remodeling is directly related to the extensive fibrosis observed in Chagas disease outcome, our objective was to evaluate the therapeutic action of an inhibitor of the signaling pathway of TGF- β (GW-788388) during acute experimental *T. cruzi* infection. For this analysis we used the model of *T. cruzi* infection (Y strain) in Swiss mice subjected to oral treatment with the compound at different days post-infection (3rd, 13th and 20th dpi). Our data revealed different therapeutic responses according to the day post-infection in which the compound was administered. When administered in the 3rd dpi, GW-788388 was able to reduce: (i) the tissue parasitism and inflammation in heart and liver, (ii) the plasma levels of AST, ALT and urea, and (iii) collagen I and fibronectin deposition in the hearts of infected animals. In this treatment scheme, GW-788388 reversed the decrease of connexin-43 expression and electrical conduction damages, suggesting a protective role of this compound in the heart, kidney and liver damage, induced by this parasitic infection. Interestingly, treatment in the 13th dpi with GW-788388, although presented similar parasitological parameters in relation to the untreated group, an increased mortality was observed, suggesting the relevance of TGF- β pathway in this period of the infection, in which mice were in systemic shock. However, when the compound administration was performed at the 20th dpi, the results revealed a significant collagen I expression decrease, indicating the effectiveness of this treatment in promoting the degradation of extracellular matrix elements in the infected cardiac tissue. In summary, TGF- β signaling pathway inhibition reduced the infection by *T. cruzi*, prevented heart damage and reversed the extracellular matrix components deposition, observed during this infection *in vivo*. The combined results suggest that blocking the activity of TGF- β may represent an important therapeutic intervention to be investigated in acute and chronic models of *T. cruzi* infection.

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Gênomica Funcional e Bioinformática
(LAGFB/IOC) e no Laboratório de Biologia
Celular (LBC/IOC) sob a orientação das
doutoras Mariana Caldas Waghbi e Elen
Mello de Souza

*“Somos o que fazemos, mas somos principalmente
o que fazemos para mudar o que somos”
Eduardo Galeano*

“A perseverança é o caminho para o êxito”

Charles Chaplin

Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, por me dar coragem, força e competência para realizar esse trabalho, pois sei que sem ele nada seria possível.

À minha mãe, Maria Helena, por ter sido minha principal incentivadora, por ter sido pai e mãe e por tudo que ela faz por mim, me ajudando e apoiando em todos os sentidos, em todos os momentos. Obrigada mãe!

À minha irmã Marília que é minha grande amiga, por toda atenção, apoio, torcida, carinho, enfim por tudo.

Ao meu grande amor Ricardo, por todo o apoio, companheirismo, pela ajuda com os programas de computador, pelo respeito que tem com os meus sonhos, pelo carinho, dedicação e principalmente por ser assim essa pessoa tão maravilhosa que cuida de mim e me atura sempre.

À minha querida avó Zilmar pelo incentivo e por estar sempre se preocupando comigo mesmo quando não precisa.

À Dra Mariana por ter sido muito mais que uma orientadora, uma amiga. Obrigada por ter me dado uma oportunidade e me ensinado tudo! Agradeço principalmente pela paciência e dedicação!

À Dra Elen que mesmo achando que não, sempre foi uma orientadora superpresente. Obrigada pela atenção, pelo carinho, pelas críticas e sugestões constantes que tanto contribuíram para a realização desse trabalho, e, sobretudo pelo exemplo profissional!

À Dra Leila por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e assim ter me dado à oportunidade de trabalhar com a sua equipe.

Às meninas das salas 101, 105 e/ou 106, todas elas, Pati (que mesmo metade fora ainda conta e muito...), Mel, Marcinha, Paloma, Lívia, Talita e Cris, por me ajudarem nos momentos necessários, pelos ensinamentos, por deixarem o ambiente de trabalho muito agradável, pelos divertidos e animados almoços juntas, pelas conversas, conselhos e principalmente por se tornarem pessoas muito queridas na minha vida. Obrigada meninas!

Aos meninos do Lab que são poucos, mas também alegam todos os nossos dias. Obrigada Léo e Leandro pelo companheirismo.

À D. Neiva por ser muito mais que uma técnica de laboratório, pela sua dedicação, carinho e por todo o cuidado que tem pelos projetos do lab.

A todas as demais pessoas do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática: Aline, Andressa, Marcos, Vanessa, Marcelo, Teca, Wim, Nicolas e Carol pelo trabalho em equipe e pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Às pessoas do LBC, Gabriel, Wanderson, Monique, que auxiliaram sempre com muito carinho no desenvolvimento deste trabalho.

À Aline Salgado, do LITEB responsável pela coloração histológica, por todo o auxílio, sempre com muito carinho, dedicação, capricho, rapidez e cuidado, com os tecidos analisados no presente trabalho.

À Dra Maria de Nazaré pela brilhante revisão deste trabalho e por abrir seu laboratório para esse projeto.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1	Grupos Experimentais	30
3.2	Classificação da fibrose conforme extensão de área marcada para colágeno	32
3.3	Anticorpos primários	35
3.4	Anticorpos secundários	36

RESULTADOS

4.1	Número de células inflamatórias por infiltrado no coração de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (15 ^o dpi) e submetidos ao Tratamento I	42
4.2	Classificação individual do grau de deposição de colágeno de acordo com a extensão de área marcada no tecido cardíaco no 15 ^o dpi	46
4.3	Parâmetros eletrocardiográficos obtidos no 15 ^o dpi dos animais tratados ou não no 3 ^o dpi	51
4.4	Parâmetros eletrocardiográficos no 15 ^o dpi dos animais tratados ou não no 13 ^o dpi	59
4.5	Classificação individual do grau de deposição de colágeno de acordo com a extensão de área marcada no tecido cardíaco no 24 ^o dpi	64

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

1.1	Mapa da distribuição geográfica da doença de Chagas	02
1.2	Mapa da expansão migratória da doença de Chagas	02
1.3	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	06
1.4	Sinal de Romã	08
1.5	Chagoma de inoculação	08
1.6	Esquema representativo do gráfico de variações de voltagem durante um ciclo eletrocardiográfico	09
1.7	Superfamília TGF- β	16
1.8	Via clássica de sinalização por TGF- β	19

MATERIAL E MÉTODOS

3.1	Estrutura química do composto GW-788388, inibidor do receptor de TGF- β	29
3.2	Atuação do composto GW-788388 sobre a via de TGF- β	29

RESULTADOS

4.1	Efeito do tratamento com GW-788388 no 3º dpi, administrado por gavage (GV) ou pela via intraperitoneal (IP)	38
4.2	Efeito do tratamento com GW-788388, administrado por gavage, no 3º dpi	40
4.3	Achados histopatológicos no 15º dpi do coração de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados com GW-788388 no 3º dpi	41
4.4	Achados histopatológicos no 15º dpi do fígado e dosagem de marcadores hepáticos e renal de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados com GW-788388 no 3º dpi	44
4.5	Amostras teciduais no 15º dpi coradas pela técnica de Tricrômica de Masson para marcação de colágeno visualizado em azul claro (Aumento 100X).	45
4.6	Análise no 15º dpi da expressão de proteínas de matriz extracelular por imunohistologia do coração de animais não infectados (NI), infectados pelo <i>T. cruzi</i> (Y) e infectados tratados com GW-788388 (Y+ GWd3)	47
4.7	Avaliação dos níveis da expressão de elementos de matriz extracelular no 15º dpi em corações de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados com GW-788388 no 3º dpi	48

4.8	Eletrocardiograma no 15 ^o dpi dos animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados com GW-788388 no 3 ^o dpi	50
4.9	Avaliação no 15 ^o dpi dos níveis de expressão de Cx43 no coração de animais não infectados e infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴), não tratados e tratados com GW-788388 no 3 ^o dpi	52
4.10	Dosagem dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) pelo <i>kit Nitric Oxide Colorimetric Assay</i> , nos animais não infectados e infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados no 3 ^o dpi	54
4.11	Efeito do tratamento com GW-788388, administrado por gavagem, no 13 ^o dpi	55
4.12	Achados histopatológicos no 15 ^o dpi do coração de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados com GW-788388 no 13 ^o dpi	57
4.13	Eletrocardiograma no 15 ^o dpi dos animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados com GW-788388 no 13 ^o dpi	58
4.14	Achados histopatológicos no 15 ^o dpi do fígado e dosagem de marcadores hepáticos e renal de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e submetidos ou não ao tratamento com GW-788388 no 13 ^o dpi	60
4.15	Amostras teciduais de corações no 20 ^o dpi coradas por tricrômica de Masson para marcação de colágeno, visualizado em azul claro (Aumento 40X)	62
4.16	Efeito do tratamento com GW-788388 administrado no 20 ^o dpi em camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴)	63
4.17	Amostras teciduais no 24 ^o dpi coradas por tricrômica de Masson para marcação de colágeno, visualizado em azul claro (Aumento 100X)	65
4.18	Avaliação no 24 ^o dpi da expressão de colágeno I no coração de animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) e tratados com GW-788388 no 20 ^o dpi	67
4.19	Dosagem no 24 ^o dpi dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) pelo <i>kit Nitric Oxide Colorimetric Assay</i> nos animais infectados pelo <i>T. cruzi</i> (10 ⁴) tratados com GW-788388 no 20 ^o dpi	68

ÍNDICE

Conteúdo

Página

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A Doença de Chagas	01
1.2. O parasito: <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
1.3 Fases da doença	07
1.3.1 Fase aguda	07
1.3.2 Fase crônica	10
1.4 Cardiomiopatia e fibrose	11
1.5 Tratamento	13
1.6 Fator de Crescimento de Transformação beta (TGF- β)	15
1.6.1 A superfamília TGF- β	15
1.6.2 Ativação de TGF- β	15
1.6.3 Sinalização por TGF- β	17
1.6.4 Papel Biológico do TGF- β	21
1.7 TGF- β na doença de Chagas	22
1.8 TGF- β como alvo para o tratamento da fibrose	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Modelo Experimental	28

3.1.1	Parasitas	28
3.1.2	Animais	28
3.1.3	Infecção <i>in vivo</i>	28
3.2	Composto e tratamento	29
3.2.1	Composto	29
3.2.2	Esquemas de tratamento	30
3.2.3	Grupos experimentais	30
3.3	Parasitemia, curva ponderal e sobrevida	30
3.4	Eletrocardiograma (ECG)	31
3.5	Coleta de plasma	31
3.6	Coleta de tecidos	31
3.7	Análise histopatológica	31
3.8	Imunohistologia	32
3.9	Dosagem de Óxido Nítrico (NO)	33
3.10	Dosagem de transaminases hepáticas e uréia	34
3.11	Extração e dosagem de proteínas	34
3.12	Eletroforese	34
3.13	Transferência	35
3.14	Western Blot	35
3.15	Captura em formato digital e Quantificação da expressão de proteínas	36
3.16	Análises estatísticas	36
4.	RESULTADOS	37
4.1	Escolha do esquema de tratamento com GW-788388	37
4.2	Tratamento I: 3º dia após a infecção por <i>T. cruzi</i>	37
4.2.1	Acompanhamento dos níveis de parasitemia, sobrevida e peso dos animais	37
4.2.2	Efeito do composto no parasitismo e inflamação no tecido cardíaco	39
4.2.3	Ação do composto em órgãos secundários	42
4.2.4	Efeito sobre a deposição de proteínas de matriz extracelular no tecido cardíaco	43

4.2.5	Efeito do composto sobre o dano elétrico cardíaco	49
4.2.6	Influência do Tratamento I sobre os níveis circulantes de NO	53
4.3	Tratamento II: 13º dia após a infecção por <i>T. cruzi</i>	53
4.3.1	Acompanhamento dos níveis de parasitemia, sobrevida e peso dos animais	53
4.3.2	Efeito do composto no parasitismo e inflamação no tecido cardíaco	56
4.3.3	Efeito do composto sobre o dano elétrico cardíaco	56
4.3.4	Ação do composto em órgãos secundários	59
4.4	Tratamento III: 20º dia após a infecção por <i>T. cruzi</i>	61
4.4.1	Ação do composto sobre a sobrevida dos animais	61
4.4.2	Efeito sobre a deposição de colágeno no tecido cardíaco	61
4.4.3	Influência do Tratamento III sobre os níveis circulantes de NO	66
5.	DISCUSSÃO	69
6.	CONCLUSÕES	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8.	ANEXOS	97
8.1	Manuscrito submetido à Plos Neglected Tropical Diseases	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Chagas

A doença de Chagas (tripanosomíase americana) é uma parasitose disseminada na América Latina, atingindo cerca de 10 milhões de pessoas segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). Ainda segundo a OMS, atualmente mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e por volta de 10.000 morrem anualmente com a doença.

A propagação da parasitose coincide com a distribuição dos vetores triatomíneos, que se estende do sul dos Estados Unidos da América (EUA) à Patagônia argentina (Figura 1.1). No entanto, a principal área endêmica da doença de Chagas abrange cerca de 20 países na América Latina (do México até o norte da Argentina) e apenas um pequeno número de casos de infecção por vetores foi relatado no sul dos EUA (Dorn e cols, 2007). Apesar disso, milhares de pessoas atingidas podem estar vivendo na América do Norte, Europa e em outros países, como resultado da migração de pessoas infectadas para essas áreas (Schmunis 2007; Coura e Viñas, 2010). A Figura 1.2 ilustra essa expansão migratória da doença de Chagas.

A descoberta da tripanossomíase americana pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (1909) foi um dos eventos mais bem-sucedidos e completos de toda a história da medicina tropical. Carlos Chagas não apenas descobriu uma nova doença humana, mas também descobriu seu agente etiológico o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), seu vetor, e os seus reservatórios. O parasito (*Schizotrypanum cruzi*) foi identificado, pela primeira vez, no tubo digestivo de insetos hematófagos, quando Carlos Chagas liderava pesquisas visando o controle da malária em Minas Gerais (Chagas, 1909; 1911 e 1922 ; Coura, 1999; Dias, 2000).

Recentemente, a doença de Chagas completou 100 anos de descoberta, mas de acordo com estudos paleoparasitológicos, já atinge humanos na América Latina há pelo menos 9.000 anos. Estes estudos estimam ainda que cerca de 40% dos ameríndios sofriam com a infecção chagásica na era Pré-Colombiana (Aufderheide e cols, 2004; revisto em Coura e Borges-Pereira, 2010).

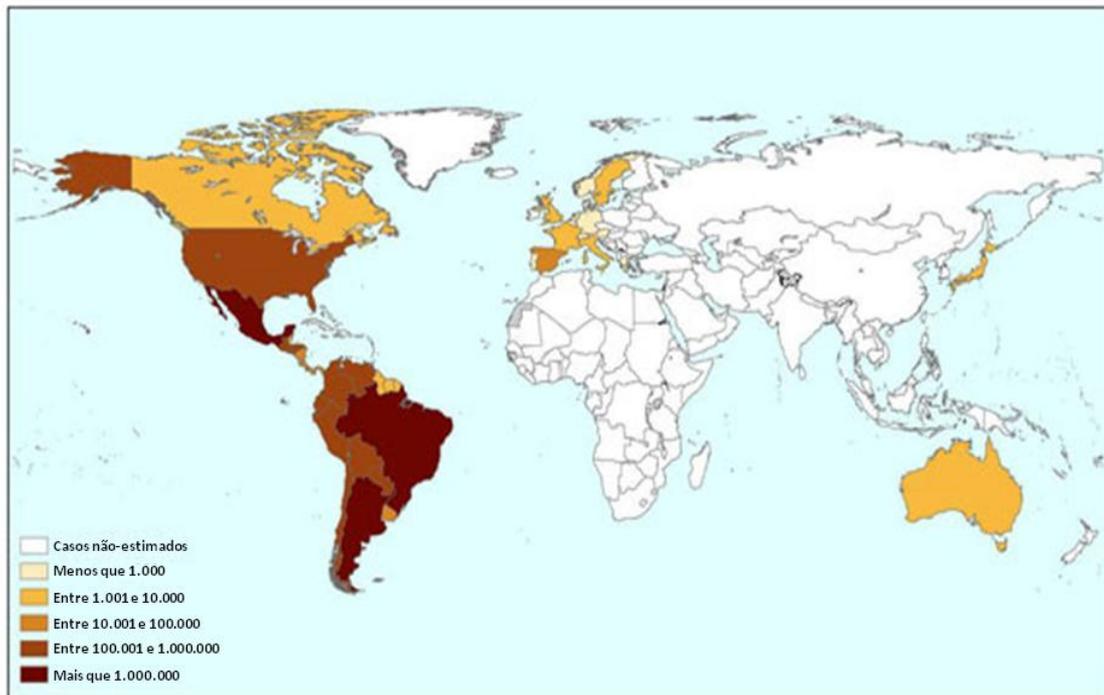


Figura 1.1: Mapa da distribuição geográfica da doença de Chagas (Imagem adaptada do endereço eletrônico http://www.treatchagas.org/imagens/MapChagasJun09_large.jpg).

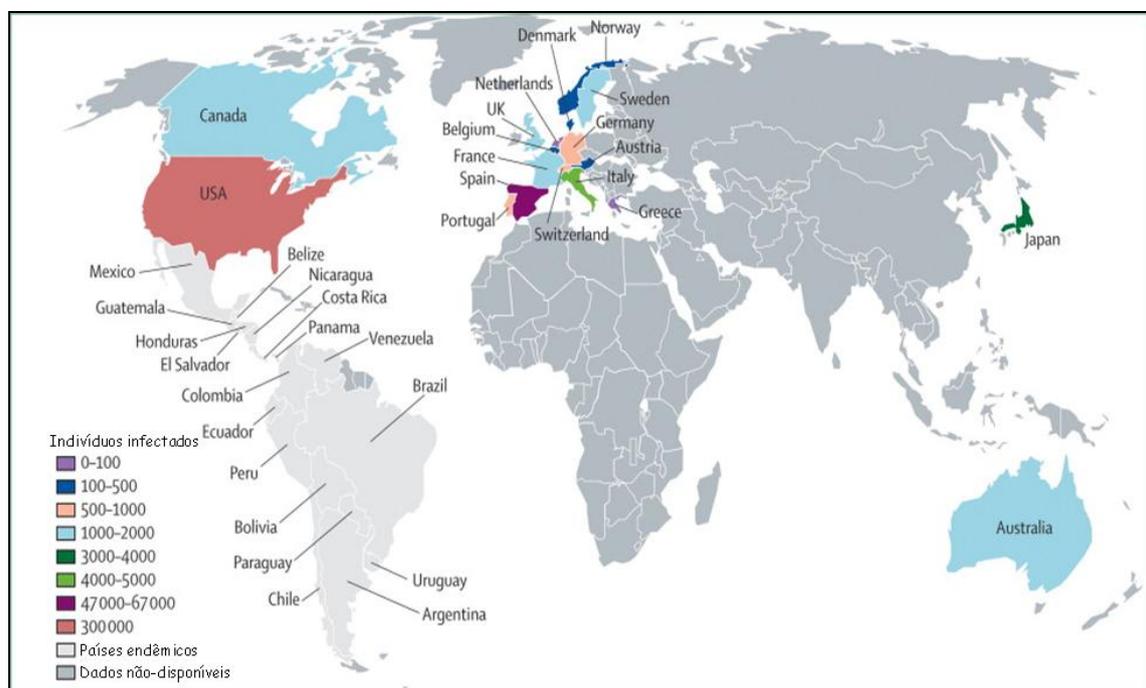


Figura 1.2: Mapa da expansão migratória da doença de Chagas (Imagem adaptada de: Rassi Jr e cols, 2010).

Inicialmente caracterizada como uma endemia rural, a doença de Chagas difundiu-se para a área urbana, devido ao desmatamento do habitat natural dos seus insetos vetores e a migração de pessoas para áreas endêmicas. A tripanossomíase ocorre principalmente em áreas rurais, como produto de ação antrópica. Sendo assim, a domiciliação do vetor está diretamente relacionada ao decréscimo da preservação de seus ecótopos naturais (revisto por Vinhaes e Dias, 2000).

A transmissão da doença de Chagas é feita principalmente pela via vetorial, através do inseto (família dos triatomíneos), vulgarmente conhecido como barbeiro, infectado pelo *T. cruzi*. O barbeiro é um inseto hematófago, que tem como fonte de alimento preferencial o sangue de marsupiais, roedores e aves, podendo utilizar sangue humano ou de animais domésticos frente à adaptação decorrente de mudanças em seu ambiente natural. Dessa forma, a doença de Chagas afeta, principalmente, populações de baixa renda que vivem em áreas rurais (revisto por Silveira, 2000).

Além da transmissão vetorial, outras formas conhecidas de transmissão da doença incluem: transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão vertical (congenita), acidentes laboratoriais ou ingestão de alimentos contaminados com as fezes e/ou urina do barbeiro ou com o próprio inseto vetor (Punukollu, 2007; Prata, 2001).

A transfusão sanguínea é a segunda principal forma de transmissão da doença. Ela é responsável pelo aumento do número de casos em países não endêmicos (como EUA, Canadá, Europa Ocidental, Austrália e Japão) em decorrência da migração de pessoas infectadas para estas áreas e da falta de monitoramento nos bancos de sangue (Reesink, 2005; Dodd, 2004). O risco de aquisição desta doença por transfusão sanguínea varia entre 10-20% e depende de vários fatores, incluindo: a concentração de parasitos no sangue do doador, os componentes do sangue do receptor e a cepa do parasito (Schmunis e cols, 1998; Bern e cols, 2008).

Além da via transfusional, a transmissão a partir do transplante de órgão ou medula de doadores portadores da doença de Chagas também tem sido bem documentada (revisto por Chagas' Disease Argentine Collaborative Transplant Consortium e Domingo Casadei, 2010). Inclusive, em regiões não-endêmicas, alguns casos de infecção mediada por transplante também têm sido reportados

(Villalba e cols, 1992; Cimo e cols, 1993; Leiby e cols, 1999). Esses casos também têm ocorrido devido ao grande número de imigrantes provenientes de áreas endêmicas da América Latina.

A transmissão congênita, a ingestão de alimentos contaminados, assim como a forma vetorial, ocorrem predominantemente nos países latino-americanos. A transmissão congênita é um grave problema nesses países, afetando até 9,5% de pessoas em algumas regiões da Bolívia (Salas e cols, 2007). A ingestão de alimentos contaminados com as fezes ou com o próprio barbeiro é uma forma mais rara de contágio. Apesar disso, esta forma de transmissão tem sido descrita em recentes microepidemias (revisto por Dias, 2006), como através do consumo de caldo de cana e açaí contaminados nos estados do Paraná e Santa Catarina, e regiões da Amazônia, respectivamente (Nobrega e cols, 2009; Valente e cols, 2009). Embora rara, a infecção a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados é geralmente associada a elevadas quantidades parasitárias, resultando em casos agudos muito graves e elevada mortalidade (Pereira e cols, 2009).

É importante destacar que essas formas de transmissão podem e devem ser evitadas com mecanismos preventivos. Estes mecanismos incluem: o monitoramento de doadores, o cozimento e descontaminação de alimentos e principalmente de controle do inseto vetor.

De fato, importantes avanços no controle da transmissão pelo inseto vetor e da via transfusional foram alcançados por países do Cone Sul através de iniciativas da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e da OMS, levando a queda na incidência de novas infecções (Dias, 2007). No entanto, ainda existem vários problemas críticos a serem enfrentados, incluindo: a falta de tratamento dos casos crônicos e o alto percentual de casos agudos em alguns países da América Latina, tais como Bolívia e México, nos quais há regiões com níveis superiores a 80% (revisto em Lescure e cols, 2010).

1.2. O parasito: *Trypanosoma cruzi*

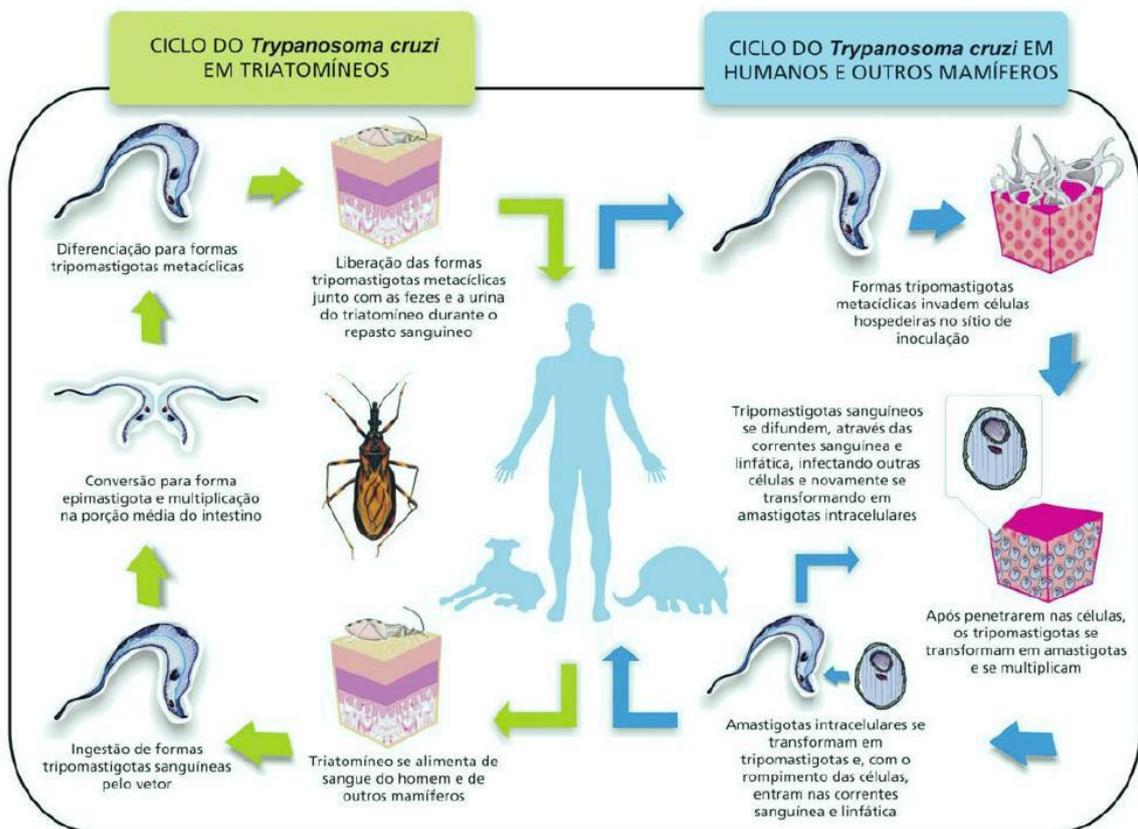
O *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário (Protozoa, Sarcomastigopora, Kinetoplastida, Trypanosomatidae) digenético e polifilético, largamente distribuído na natureza, sendo sua circulação primária entre

os insetos vetores (Triatominae, Hemíptera, Reduviidae) e os mamíferos silvestres pertencentes às ordens Marsupialia, Edentata, Carnivora, Rodentia, Artiodactyla, Perissodactyla, Chiroptera e Primata (revisado por Dias, 2006). Este parasito é infectante para um grande número de espécies, mas a intensidade da infecção depende de vários fatores: da cepa do parasito, da dose inoculada, da idade e perfil genético do hospedeiro (revisado por De Souza, 2002).

O ciclo de vida desse protozoário, ilustrado na Figura 1.3, inclui várias formas distintas morfológica e biologicamente. Duas formas multiplicativas: epimastigotas (presentes no inseto vetor) e amastigotas (presentes no hospedeiro vertebrado) e duas formas infectivas: tripomastigotas metacíclicos (presentes no inseto vetor) e tripomastigotas sanguíneos (presentes no hospedeiro vertebrado). Além dessas, ainda são encontradas formas intermediárias (De Souza, 2002). Muitos estudos têm mostrado que as formas amastigotas também apresentam capacidade infectiva, ou seja, podem progredir e/ou manter a infecção (De Carvalho e De Souza, 1986; Ley e cols, 1998; Scharfstein e Morrot, 1999).

As formas epimastigotas (não infectantes) são encontradas na porção média do intestino do barbeiro. São formas com multiplicação ativa, por divisão binária longitudinal, que se diferenciam em formas infectantes (tripomastigotas metacíclicos) na porção mais distal do intestino do inseto. A forma alongada, tripomastigota, também pode ser encontrada nos tubos de Malpighi dos triatomíneos (revisado por Dias, 2006). O parasito, porém, não se aloja nas glândulas salivares do inseto. Tripomastigotas metacíclicos são eliminados junto às fezes do inseto, podendo invadir o tegumento através da conjuntiva, mucosas ou lesões cutâneas, próximos ao local da picada do inseto.

As formas metacíclicas podem infectar diferentes tipos celulares, em especial macrófagos, induzindo a produção de interferon γ , que é um fator ativador de células inflamatórias, como macrófagos e células *Natural Killer* (NK) (principais produtores de IFN- γ), envolvidas na resposta imune inata (revisado por Coura e Borges-Pereira, 2010). Intracelularmente, os tripomastigotas se diferenciam em formas arredondadas sofrendo uma reorganização estrutural, com encurtamento do flagelo. Assim, convertem-se em formas conhecidas como amastigotas e iniciam a fase de multiplicação intracelular.



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Figura 1.3: Ciclo biológico de *T. cruzi* (Imagem retirada do endereço eletrônico <http://miriamsalles.info/wp/wp-content/uploads/ciclotrypanosomacruz.jpg>).

O ciclo intracelular dura em média 96 horas. Após a conversão dos amastigotas para tripomastigotas e frente à intensa movimentação destas últimas formas, há a ruptura da membrana plasmática da célula hospedeira e consequente liberação dos parasitos para o meio extracelular. Estes, podem então invadir células vizinhas ou cair novamente na corrente sanguínea, alcançando novos tecidos e órgãos. Embora qualquer célula nucleada de mamífero possa ser potencialmente parasitada por estes organismos, foi relatado um maior tropismo para células do sistema retículo-endotelial e dos sistemas nervoso e muscular, incluindo o coração. Os indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, ao serem picados pelo *Triatoma*, transmitem o parasito para o inseto, mantendo assim o ciclo da doença (revisto por Teixeira e cols, 2006a).

1.3. Fases da doença:

1.3.1 Fase aguda:

Esta fase tem como características principais: a curta duração (1 a 6 meses) e a presença de parasitos no sangue do indivíduo infectado. Pode ocorrer a presença de lesões na porta de entrada do parasito, podendo ser ocular (sinal de Romaña) ou cutânea (Chagoma de inoculação). O Sinal de Romaña (Figura 1.4) é um edema bipalpebral e o Chagoma de inoculação (Figura 1.5) é uma formação cutânea ligeiramente saliente, arredondada, eritematosa, dura, indolor, quente e circundada por edema elástico, assemelhando-se a um furúnculo que não supura, mas que às vezes pode exulcerar.

Outras manifestações clínicas comuns são: febre, mal-estar, cefaléia, dores musculares, cansaço, perda de apetite, edema e hipertrofia de linfonodos. Apesar disso, é comum a sintomatologia passar despercebida, podendo ser confundida com uma gripe comum. Em menor frequência, também pode ocorrer hepatoesplenomegalia, podendo se agravar para uma forma meningoencefálica, principalmente, nos primeiros meses ou anos de vida (Muñoz-Saravia e cols, 2010).



Figura 1.4: Sinal de Romaña (imagem retirada do endereço eletrônico <http://www.jyi.org/features/ft.php?id=185>).



Figura 1.5: Chagoma de inoculação (imagem retirada de Kinoshita-Yanaga e cols, 2009).

Além disso, essa fase da doença pode apresentar uma miocardite que, na maioria das vezes, só é perceptível através de exames de eletrocardiogramas (ECG) e ecocardiogramas. Nesta fase, a miocardite é causada pela intensa presença de ninhos de amastigotas, acompanhado de miocitólise e uma vasculite intensa. As alterações eletrocardiográficas estão diretamente relacionadas ao acometimento cardíaco. As principais alterações cardíacas encontradas nesta fase incluem: prolongamento do espaço PR, alterações primárias de onda T (baixa voltagem, bifasismo ou inversão) e extrassístoles ventriculares. Essas ondas estão esquematizadas na Figura 1.6. Nos casos de cardiopatia chagásica aguda mais graves são observados bloqueios intraventriculares com alterações das ondas T. Também é possível observar cardiomegalia, devido a miocardite e ao derrame pericárdico, com insuficiência cardíaca congestiva. Essas alterações cardíacas podem, inclusive, levar a morte súbita (revisito por Rassi Jr e cols, 2010).

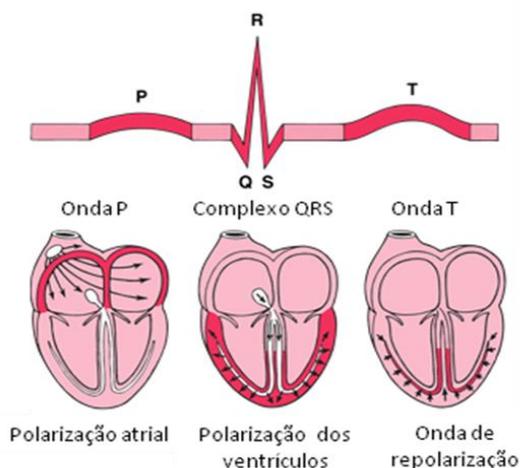


Figura 1.6: Esquema representativo do gráfico de variações de voltagem durante um ciclo eletrocardiográfico (imagem adaptada do endereço eletrônico <http://www.clinicard.site.br>).

Nessa fase da infecção há uma intensa reação inflamatória constituída principalmente por células linfomononucleares, como linfócitos e macrófagos, acompanhada por aumento da expressão de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda e óxido nítrico sintase. De acordo com estudos em murinos (Abrahamsohn e Coffman, 1996; Aliberti e cols, 1996; Silva e cols, 1998; Martins e cols, 1999), e humanos (Abel e cols, 2001; Lorena e cols, 2008 e 2010) as principais citocinas promotoras dessa resposta inflamatória

são: interferon γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12). Essa forte resposta inflamatória tripanocida, do tipo Th1, tem um papel protetor e envolve a participação de moléculas de óxido nítrico (Chandra e cols, 2002; Gutierrez e cols, 2009).

Em contrapartida, outras citocinas também estimuladas durante a infecção, incluem: interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento de transformação β (TGF- β), atuam de forma anti-inflamatória. Estas citocinas, por sua vez, estão relacionadas a um aumento da replicação do parasito através da inibição da atividade dos macrófagos (Silva e cols, 1991; Reed e cols, 1994). Estudos sugerem que a persistência do parasito e a resposta imune a ele dirigida desempenhem um papel central para o desenvolvimento da doença (Tarleton, 2003; Bonney e Engman, 2008).

É importante ressaltar que essas manifestações clínicas, típicas da fase aguda da doença, regridem espontaneamente na maior parte dos indivíduos infectados, independentemente de qualquer tratamento. Além disso, entre 60-70% desses pacientes nunca desenvolvem clinicamente a doença crônica, permanecendo assintomáticos por toda a vida e somente 30 – 40% dos indivíduos infectados de fato, após anos ou décadas desenvolvem a forma crônica sintomática (Coura e Borges-Pereira, 2010).

1.3.2 Fase crônica:

Inicia-se após a fase aguda sendo caracterizada por baixa parasitemia. A infecção crônica pode apresentar a forma indeterminada (assintomática) ou a forma determinada, na qual, muitos anos após a infecção, há evidências de comprometimento cardíaco, digestivo ou neurológico.

Pacientes na forma indeterminada são assintomáticos e órgãos como o coração e o trato gastrointestinal não apresentam nenhum resultado patológico significativo quando submetidos a exames como ECG, radiografias e ultrasonografias. Pacientes assintomáticos são diagnosticados somente através de exames sorológicos que identifiquem anticorpos anti- *T. cruzi*. Existem casos em que a fase assintomática é interrompida por episódios característicos de infecção aguda. Essa situação é comum em pacientes com doenças imunossupressoras,

como os pacientes HIV-positivos (Prata, 2001; Teixeira e cols, 2006a; Karp e Auwerter, 2007).

Com relação aos pacientes crônicos sintomáticos, a maior parte deles desenvolvem a forma cardíaca da doença de Chagas. Os demais apresentam a forma gastrointestinal (principalmente: megacólon e megaesôfago) e alterações no sistema nervoso periférico. Somente um pequeno número de pacientes manifestam ambas as formas da doença, tanto a cardíaca quanto a gastrointestinal (revisto por Coura e Borges-Pereira, 2010).

1.4. Cardiomiopatia e fibrose:

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é a forma mais grave da doença e representa a principal causa de mortalidade dos pacientes. Estima-se que cerca de 60% dos pacientes faleçam de cardiomiopatia grave (Muñoz-Saravia e cols, 2010).

A CCC é caracterizada pela destruição progressiva das fibras cardíacas, seguida de intensa fibrose e da hipertrofia dos cardiomiócitos remanescentes. Isso faz com que os pacientes crônicos tenham uma série de problemas cardíacos como: distúrbios de condução atrial, arritmias ventriculares, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo pulmonar e sistêmico, podendo levar à morte súbita (Rassi, 2009).

Em relação à fibrose cardíaca, esta tem sido relatada em pacientes chagásicos desde o seu primeiro estudo histopatológico (Vianna, 1911) e até hoje é um dos principais achados nos tecidos cardíacos de pacientes crônicos. A fibrose é um processo que envolve a substituição de tecidos danificados, frente a uma resposta inflamatória, por tecido conjuntivo, podendo levar ao comprometimento funcional do tecido (Ihn, 2002; Pohlers e cols, 2009). Esse processo, em diferentes tecidos, é regulado por diversas citocinas e fatores de crescimento solúveis. Duas citocinas, o TGF- β e o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), desempenham papel fundamental no processo fibrinogênico. TGF- β induz a síntese de componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos e CTGF regula a atuação de TGF- β sobre os fibroblastos (Ihn, 2002; Verrecchia e Mauviel, 2007).

Na CCC, a fibrose é caracterizada pelo progressivo enrijecimento das paredes ventriculares e envolve o acúmulo excessivo de proteínas de matriz

extracelular e de células fibroblásticas nas regiões perivascular e intersticial do miocárdio. As principais lesões fibróticas encontradas nos corações chagásicos são as observadas no ápice e na parede basal inferior do ventrículo esquerdo (Reis e cols, 2000). Além da presença de fibrose exacerbada, a CCC, geralmente, envolve um aumento progressivo do volume cardíaco. Esse aumento é devido à dilatação das paredes da câmara e do septo e às diferentes disfunções cardíacas observadas pelo ECG e/ou ecocardiograma (revisto por Biolo e cols, 2010).

As alterações eletrocardiográficas relacionadas aos casos mais graves da doença incluem: bloqueio do ramo direito, hemibloqueio do ramo esquerdo anterior, extra-sístoles ventriculares, bradicardia sinusal, fibrilação auricular e bloqueio atrioventricular total (Prata, 2001; Torrico e Castro, 2002; Teixeira e cols, 2006b; Dubner e cols, 2008). Outros eventos típicos de casos avançados da doença são: miocardite, eventos tromboembólicos e insuficiência cardíaca congestiva. Outro achado histopatológico importante é o baixo parasitismo nos tecidos e órgãos dos pacientes chagásicos crônicos (Braga e cols, 2000; Lauria-Pires e cols, 2000). Apesar disso, dados utilizando ferramentas metodológicas mais sensíveis, como por exemplo, PCR do tecido, tem revelado a persistência antigênica nos tecidos de pacientes crônicos, rebatendo o conceito anterior que atribuía às lesões teciduais nesta fase unicamente a eventos auto-ímmunes (Dutra e Gollob, 2008).

O padrão histopatológico do coração de pacientes com CCC apresenta ainda intenso processo inflamatório com predominância de células T, B e macrófagos, fibrose intersticial difusa e morfologia alterada dos cardiomiócitos. Além disso, o sistema cardíaco de condução elétrica também apresenta importantes alterações (Tafuri e cols, 1973; Oliveira, 1985; Rossi, 2001).

O acoplamento entre as células cardíacas é mediado por canais constituídos por junções comunicantes do tipo *Gap*. Estas junções auxiliam a propagação dos impulsos elétricos, permitindo assim, a manutenção da sincronia da contração do tecido cardíaco. Esses canais são formados por proteínas transmembranas, denominadas conexinas, sendo a Conexina 43 (Cx43), a principal forma encontrada no tecido cardíaco. Durante uma injúria, o tecido cardíaco sofre remodelamento de Cx43 que em alguns casos pode afetar diretamente a condução elétrica (revisto em Song e cols, 2009). Esse remodelamento pode ocorrer de duas formas: alteração na distribuição das placas de Cx43 ou alterações na expressão da proteína. Muitos estudos têm mostrado que células cardíacas infectadas com *T.*

cruzi apresentam alterações da organização e diminuição da expressão de junções do tipo *Gap* em áreas de membrana aposicional, levando a perda da comunicação juncional e redução da automaticidade cardíaca (Campos de Carvalho e cols, 1992; Adesse e cols, 2008; Waghbi e cols, 2009b).

1.5. Tratamento:

A doença de Chagas é uma patologia negligenciada, ou seja, uma doença que não atrai o investimento por parte das grandes indústrias farmacêuticas, pois atinge majoritariamente populações menos favorecidas. Até hoje esta doença não apresenta tratamento eficaz, principalmente, para os doentes crônicos.

A terapia dos pacientes ainda é feita com drogas desenvolvidas nas décadas de 1970 e 1980 quando os medicamentos Nifurtimox (produzido pela Bayer) e Benzonidazol (produzido no Brasil pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco- Lafepe) foram adotados no uso clínico para doença de Chagas (Gallerano e cols, 1990; Dias e Schofield, 1999; Teixeira e cols, 2006a). Ambos quimioterápicos são eficazes apenas se adotados na fase aguda ou crônica recente da doença e apresentam efeitos secundários tóxicos, incluindo hepatotoxicidade, além de reações alérgicas.

Devido aos efeitos colaterais o Nifurtimox foi descontinuado no Brasil, na Argentina, no Chile e no Uruguai. Nestes países, o tratamento é realizado utilizando, principalmente, o benzonidazol. Além disso, diversos estudos têm mostrado a ocorrência de cepas de *T. cruzi* resistentes a ambos os fármacos (Brener, 2000; Barret e cols, 2003, Biolo e cols, 2010).

No Brasil, o tratamento etiológico durante a fase crônica da doença é controverso. Ele é recomendado pelo Ministério da Saúde para todos os pacientes em fase aguda ou em fase crônica recente (até 12–15 anos após a infecção inicial). Para os pacientes com CCC é sugerido o acompanhamento individualizado devido à gravidade da lesão que possuem e aos eventuais efeitos indesejáveis do tratamento com benzonidazol. Apesar de alguns estudos mostrarem que o tratamento com benzonidazol é eficaz tanto em modelos animais (Garcia e cols, 2005), como em humanos (Sosa e cols, 1998; Viotti e cols, 2006), a indicação do tratamento tripanocida em adultos com CCC divide a opinião dos pesquisadores quanto a sua eficácia.

Estes resultados estimularam a criação do BENEFIT (Benzonidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis), que se baseia em um estudo randômico que visa analisar se o tratamento com benzonidazol, nas doses habituais, modifica ou não a evolução da cardiopatia chagásica crônica (Marin-Neto e cols, 2008). Esse estudo envolve grupos no Brasil, Argentina, Bolívia e Colômbia e prevê o acompanhamento de 3 mil pacientes cardiopatas chagásicos crônicos (Marin-Neto e cols, 2009).

A terapia celular é uma modalidade terapêutica que tem sido amplamente utilizada em cardiopatias (revisto por Henning, 2011). O interesse em utilizar a terapia celular, para o tratamento de CCC surgiu a partir dos resultados de pesquisas sobre o uso desta modalidade em casos de infarto do miocárdio (revisto por Tanowitz e cols, 2009). Muitos estudos em modelos animais de infecção por *T. cruzi* e em pacientes chagásicos mostraram que o transplante de células mononucleares de medula óssea, ou de outras fontes de células-tronco é capaz de gerar uma recuperação da função cardíaca (Soares e cols, 2004; Guarita-Souza, 2006; Vilas-Boas e cols, 2004 e 2006). O potencial benefício da terapia celular para o tratamento da insuficiência cardíaca chagásica está atualmente sendo avaliado em um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, financiado pelo Ministério da Saúde. (Tura e cols, 2007). Dados parciais sugerem a recuperação parcial da função cardíaca através desta abordagem terapêutica. No entanto, um pequeno ganho na função cardíaca pode refletir em uma melhora significativa na qualidade de vida e, portanto, não deve ser ignorado.

Apesar dessas perspectivas, os pacientes que estão na fase crônica da doença são ainda tratados com terapia de suporte, de forma a reduzir os sintomas clínicos, incluindo tratamento antiarrítmico como a amiodarona, e a utilização de marcapassos ou de cardioversores-desfibriladores implantáveis. Em alguns casos, ainda mais graves, o transplante cardíaco constitui-se a única opção (revisto por Biolo e cols, 2010). Sendo assim, o desenvolvimento de novas terapias e possibilidades profiláticas representam importantes desafios para o controle dessa doença.

1.6. Fator de Crescimento de Transformação beta (TGF- β)

O TGF- β é uma proteína homodimérica que pertence à superfamília TGF- β . Esta citocina é uma molécula multifuncional com fortes efeitos sobre o sistema imunológico. TGF- β é secretado por muitos tipos celulares tais como: células T, fibroblastos, células epiteliais e plaquetas (Lawrence, 1995; Massague, 1998)

1.6.1 A superfamília TGF- β

A superfamília TGF- β é composta por um grande número de fatores de crescimento polipeptídicos estruturalmente relacionados. Estes fatores (resumidos na Figura 1.7) são produzidos por diversos tipos de células e são capazes de regular uma série de processos celulares, incluindo: proliferação, determinação de linhagem, diferenciação, mobilidade, adesão e apoptose (Massagué, 1998). A superfamília TGF- β engloba uma ampla variedade de proteínas sinalizadoras, entre elas: isoformas de TGF- β , activinas, proteínas morfogênicas do osso (BMPs), inibinas, substância inibidora Mülleriana e fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) (Roberts e Sporn, 1993; Dubois e cols, 1998; Piek e cols, 1999; Moustakas e Heldin, 2005).

A atividade biológica do TGF- β depende de sua interação com receptores específicos que transduzem o sinal bioquímico, resultando em um efeito biológico. Somente a molécula ativa é capaz de se ligar ao seu receptor, e este mecanismo representa um sistema típico de interação ligante-receptor, seguido de transdução de sinal e culminando em um efeito final (Massagué, 1998).

1.6.2 Ativação de TGF- β

TGF- β é sintetizado como uma forma precursora latente que é clivada, em sua via secretória, em um própeptídeo amino-terminal e um fragmento carboxi-terminal, que constitui o fator de crescimento maduro. Apesar disso, o

Ligante	R Tipol	R Tipol	R-Smad	Co-Receptor	Moléculas Reguladas
TGF-β	TGF-β RII	ALK-5 ALK-2 ALK-1	smad2/3 smad1/5/8	Betaglycan (TGF-β2+) Endoglin (ALK-1 specific) CD109	α ₂ -macroglobulin BAMBI/NMA+ biglycan cripto+ decorin KCP/Crim 2 LAP s-betaglycan s-TGF-β RII
Activin	Act RII/IIB	ALK-4 ALK-2	smad2/3 smad1/5/8		activin AC/BC/AE/CE BAMBI/NMA+ cripto DAN FLRG endoglin follistatin inhibin: betaglycan+ KCP/Crim 2 s-Act RII/IIB
Inhibin	Act RII/IIB BMP RII/IIB	--	--	Betaglycan +	
BMP	BMP RII/IIB Act RII/IIB	ALK-1 ALK-2 ALK-3 ALK-6 ALK-4 ALK-5 ALK-7 ALK-2	smad1/5/8 smad2/3 smad1/5/8	RGM-A/-B/-C	BAMBI/NMA+ chordin: Tsg endoglin FLRG follistatin gremlin inhibin: betaglycan+ KCP/Crim 2 nodal: BMP-7 noggin noggin: SOST PRDC s-ALK-3 SOST USAG-1
GDF	BMP RII Act RII/IIB	ALK-5 ALK-6 ALK-4 ALK-5 ALK-6	smad2/3 smad1/5/8 smad2/3 smad1/5/8	Cripto (GDF-1/3) +	DAN follistatin propeptide (GDF-8,11)
Nodal	Act RII/IIB	ALK-4 ALK-7	smad2/3	Cripto +	BMP-7: nodal cerberus DAN lefty
Lefty	Act RII/IIB	--	--	Cripto (+nodal) +	
MIS	MIS RII	ALK-2 ALK-3 ALK-6	smad1/5/8		

Abreviações:
MIS: Substância inibidora Mülleriana
BAMBI: Inibidor membranar de BMP e activina
KCP: Regulador de BMP rico em cisteína
FLRG: Gene relacionado à follistatina

ALK: TβRI
Tsg: Proteína Twisted gastrulation
PRDC: Proteína Dan e Cerberus relacionada
SOST: Esclerostina
USAG-1: Gene relacionado à sensibilização uterina

Figura 1.7: Superfamília TGF-β (Imagem adaptada do endereço eletrônico http://www.rndsystems.com/dam_public/5895.pdf).

TGF- β maduro permanece associado não covalentemente com seu própeptídeo após a secreção (Murphy-Ullrich e Poczatek, 2000). Enquanto o TGF- β maduro está associado ao seu própeptídeo, não é reconhecido pelos seus receptores de sinalização. Por este motivo, o termo “proteína associada à latência (LAP)” é usado para designar o própeptídeo TGF- β . Uma família de grandes glicoproteínas secretoras, conhecidas como proteínas de ligação a TGF- β latente (LTBPs), são covalentemente associadas a LAP através de pontes dissulfeto. As LTBPs atuam no processo de estoque de TGF- β latente na matriz extracelular, no entanto, não são fundamentais para a manutenção da latência de TGF- β , mas podem facilitar a secreção, o armazenamento ou a ativação do complexo de LAP-TGF- β (revisto por Massagué e Chen, 2000).

O processo fisiológico de ativação de TGF- β latente é dependente de várias etapas. A forma latente pode ser ativada por diferentes fatores incluindo proteases, trombospondina, endoglicosidases e mudanças de pH ou temperatura (Hall e cols, 1992). É possível que, em condições fisiológicas (*in vivo*), um determinado mecanismo de ativação de TGF- β latente seja dominante em relação aos outros, e evidências genéticas apontam para a atividade de trombospondina-1 e integrina $\alpha\text{v}\beta 6$ como os principais responsáveis pelo processo (Ludlow e cols. 2005). Além destes fatores, metaloproteases -2 e -9 também já foram descritos como ativadores de TGF- β latente (Yu e Stamenkovic, 2000).

1.6.3 Sinalização por TGF- β

Uma vez ativado, o TGF- β passa a ser reconhecido pelos seus receptores de superfície específicos, desencadeando o processo de sinalização intracelular. TGF- β apresenta três receptores de superfície já identificados em praticamente todos os tipos celulares estudados: receptor para TGF- β tipo I (T β RI), receptor para TGF- β tipo II (T β RII) e receptor para TGF- β tipo III (T β RIII). Os receptores do tipo I e do tipo II são moléculas transmembranares com domínio serina/treonina cinase (Massagué, 1998; Lijnen e cols, 2000).

Os T β RIII, conhecidos como betaglicanas não têm um papel direto na via de sinalização de TGF- β , mas a regulam, facilitando ou dificultando o acesso de TGF- β aos receptores do tipo I e II. As betaglicanas se ligam às três formas de TGF- β com alta afinidade, concentrando-as na superfície celular, facilitando a sua

associação aos receptores (Massagué, 1998). O papel de receptor acessório das betaglicanas é mais evidente com TGF- β do tipo II, pois esta molécula apresenta baixa afinidade para T β RII e as betaglicanas atuam facilitando essa ligação. O outro membro dessa família, a endogлина também é um receptor acessório da via de sinalização de TGF- β , ligando principalmente T β RI (Massagué e Chen, 2000).

Após a associação de TGF- β ao T β RII, seguida pelo recrutamento do T β RI há a formação de um complexo heterotetramérico (Massagué, 1998; Lutz e Knaus, 2002). T β RI é transfosforilado na sua região justamembranar, rica em glicina e serina, denominada GS-Box. Esta fosforilação é mediada por T β RII resultando na ativação de T β RI. Esta ativação não é decorrente de um aumento da atividade cinase, mas é baseada na formação de um sítio de ligação para as proteínas Smads, que representam o substrato para T β RI (Lutz e Knaus, 2002).

As proteínas Smads compõem uma família de fatores de transcrição e são substratos para T β RI. Essas proteínas podem ser divididas em três sub-famílias: (i) Smads ativadas pelo receptor (R- Smad) incluindo Smads ativadas por BMP (Smad 1, 5 e 8) e por TGF- β (Smad 2 e 3); (ii) o mediador comum Smad 4 (Co- Smad), e (iii) as Smad inibitórias, Smad 6 e 7 (I-Smad) (Massagué, 1998).

T β RI também apresenta atividade cinase e uma vez ativado, fosforila as R-Smads no motivo SSXS da porção C-terminal que é conservado entre todas as R-Smads. A fosforilação induz a dissociação do receptor e a formação de um sítio âncora para Smad 4, formando então um complexo heteromérico. Esse complexo de Smads é translocado para o núcleo, onde se associa a co-fatores e co-moduladores que se ligam ao DNA para ativar a transcrição de determinados genes responsivos a TGF- β . A escolha dos genes alvo é determinada pela composição do complexo de transcrição formado (Massagué e Chen, 2000; Lutz e Knaus, 2002).

As proteínas Smad são os únicos substratos conhecidos para T β RI capazes de promover funções de sinalização celular em resposta a TGF- β . Embora outras proteínas também possam interagir com o receptor e mediar o processo de sinalização, a característica de transmissão de sinal diretamente do receptor para a maquinaria transcricional é unicamente deflagrada pelas Smads (Piek e cols, 1999). As proteínas Smads inibitórias são induzidas pela sinalização por Smad, acumuladas no núcleo e podem ser então exportadas após estímulo via TGF- β . Em seguida, as I-Smads se ligam aos receptores do tipo I e exercem “feedback”

negativo, através do bloqueio da fosforilação de proteínas R-Smads e da formação do complexo R-Smad–Co-Smad. Este complexo estimula então a defosforilação do receptor pelo recrutamento de fosfatases e pela promoção da ubiquitinação e degradação lisossomal do receptor (Moustakas e Heldin, 2005).

A via clássica das Smads (resumidamente esquematizada na Figura 1.8) é de extrema importância durante as etapas do desenvolvimento animal. (Barolo e cols, 2002; Waite e Eng, 2003). Contudo, novas evidências bioquímicas apóiam a idéia de que vias alternativas, também participem da sinalização por TGF- β .

A sinalização por vias alternativas possui três mecanismos principais que contribuem para as respostas fisiológicas dependentes de TGF- β :

- (1) vias de sinalização independentes de Smads podem modificá-las diretamente (ex.: fosforilação), e assim, modular a atividade de efetores centrais;
- (2) as proteínas Smads podem interagir e modular diretamente a atividade de outras proteínas sinalizadoras (ex.: cinases), deste modo, transmitindo sinais a outras vias e
- (3) os receptores de TGF- β interagem diretamente com proteínas não-Smad, iniciando uma sinalização paralela que colabora com a via das Smads na produção de respostas fisiológicas.

Assim, transdutores de sinal não-Smad sob o controle de TGF- β fornecem regulação quantitativa da via de sinalização e servem como pontos de interação cruzada com outras importantes vias de sinalização, como as da tirosina cinase, receptores acoplados a proteína G ou outros receptores de citocinas (revisado por Moustakas e Heldin, 2009).

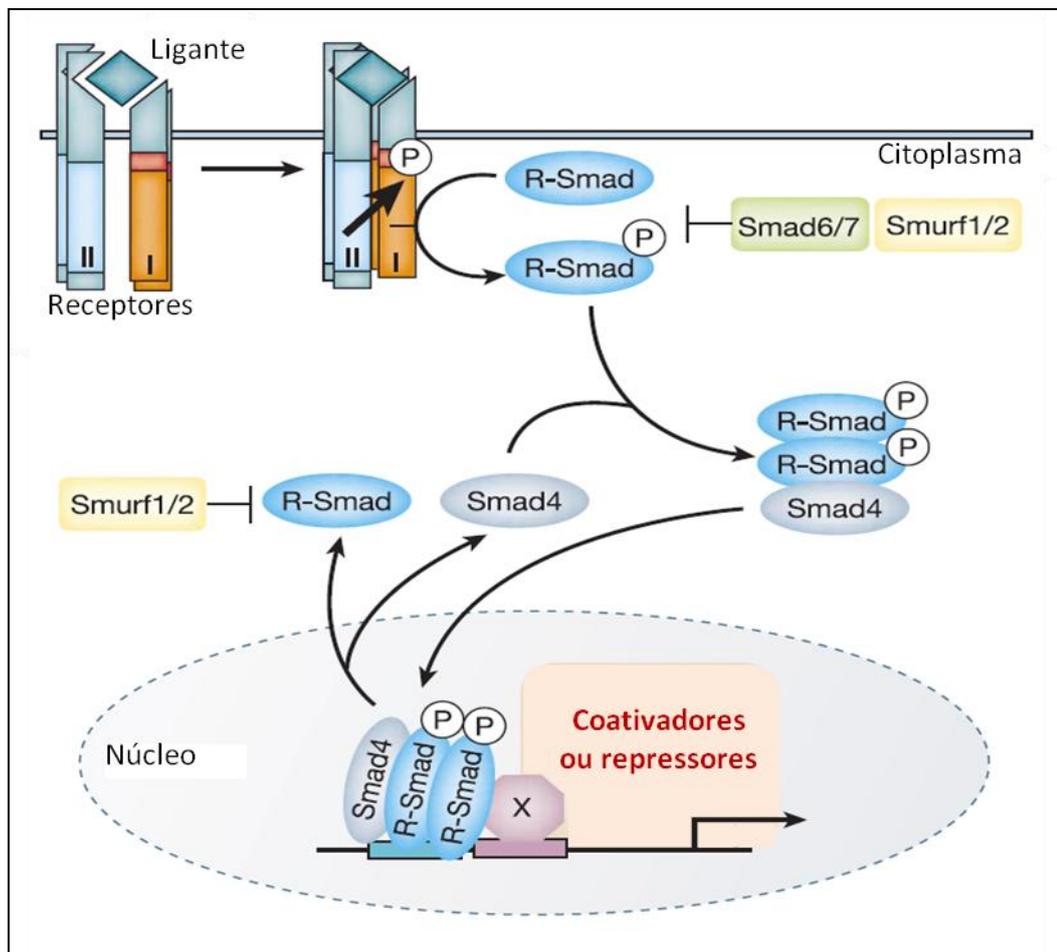


Figura 1.8: Via clássica de sinalização por TGF-β. (R-Smad: smad regulatória; P: fósforo). (Imagem adaptada de Derynck e Zhang, 2003).

1.6.4 Papel Biológico do TGF- β

O TGF- β foi inicialmente descrito como fator transformador de crescimento e proliferação de células tumorais (Todaro e cols, 1980). No entanto, estudos posteriores indicaram que ele apresentava uma função pleiotrópica, podendo desempenhar atividades proliferativas e anti-proliferativas, sendo capaz tanto de inibir como estimular o crescimento de um mesmo tipo celular, dependendo das condições da cultura e do grau de confluência das células (Massagué, 1998).

Além da ação na proliferação celular, o TGF- β é uma das principais citocinas envolvidas na regulação da formação e degradação de matriz extracelular (Massagué, 1998), induzindo a expressão de vários componentes de matriz, como fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina e trombospondina (Taipale e cols, 1996).

Assim o TGF- β regula processos celulares, envolvidos na: embriogênese, remodelamento de tecidos, cicatrização e resposta inflamatória (Shi e Massagué, 2003). TGF- β é comumente classificado como uma citocina anti-inflamatória, de resposta Th-2, reguladora do sistema imunológico. Os mecanismos coordenados pelas vias de sinalização de TGF- β incluem: i) supressão da diferenciação de células T efetoras; ii) conversão de células T naive em células T regulatórias; iii) inibição da proliferação de células T e B; iv) inibição da produção de citocinas efetoras, tais como IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α e; v) supressão da atividade de macrófagos, células dendríticas e células NK.

A supressão da ativação de macrófagos ocasiona, também, a inibição na produção de óxido nítrico (NO). Essa inibição da produção de NO por TGF- β não se deve apenas pela supressão da ativação de macrófagos, mas também pela sua capacidade de estimular a atividade de arginase, que é um inibidor competitivo da enzima Óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Stempin e cols, 2009). A produção de NO está relacionada a importantes processos fisiológicos e patológicos, incluindo a destruição de microorganismos infecciosos (revisto por Guzik e cols, 2003) e a regulação de metaloproteinases de matriz extracelular (Filippin e cols, 2011).

Alterações nas vias de sinalização de TGF- β estão relacionadas a muitas doenças humanas. A perda de respostas inibidoras do crescimento via TGF- β é frequentemente observada em células de câncer, e um aumento na atividade de

TGF- β desempenha um papel central na fibrose. As alterações na atividade desta citocina também estão implicadas em doenças inflamatórias não infecciosas (revisto por Massagué, 1998). Conforme citado, TGF- β está envolvido na regulação e no desenvolvimento de varias patologias humanas.

1.7 TGF- β na doença de Chagas

Muitos estudos têm demonstrado que TGF- β está envolvido na regulação celular das diferentes etapas do ciclo de vida e infectividade de *T. cruzi*, além de estar diretamente envolvido com o desenvolvimento da doença de Chagas e suas manifestações clínicas (revisto por Araujo-Jorge e cols, 2008). Desde 1991 (Silva e cols), tem sido descrito o papel regulatório de TGF- β durante a infecção pelo *T. cruzi*, quando foi observado em ensaios *ex vivo* o aumento de sua expressão.

Gazzinelli e cols (1992) mostraram que o TGF- β é um potente inibidor do efeito tripanocida de INF- γ , sendo responsável pelo aumento da replicação de *T. cruzi* em macrófagos. Hoje se sabe que o *T. cruzi* é capaz de ativar diretamente TGF- β latente, favorecendo o processo de invasão celular (Waghabi e cols, 2005b). Sabe-se ainda que a invasão do *T. cruzi* nas células hospedeiras é dependente da expressão e atividade dos seus receptores e da via de sinalização dependente de Smads (Ming e cols, 1995; Hall e Pereira, 2000). Estudos com cardiomiócitos infectados *in vitro* por *T. cruzi* demonstraram que formas amastigotas de *T. cruzi* são capazes de captar e internalizar TGF- β do hospedeiro, estocando-o. Estes dados sugerem um novo papel de TGF- β no ciclo celular do parasito: seu uso na sinalização da interrupção da proliferação celular e início da diferenciação para formas tripomastigotas (Waghabi e cols, 2005a), o que pode refletir uma dependência por uma molécula da célula hospedeira que regule o ciclo intracelular do parasito.

De forma geral, a soma destes dados suporta a hipótese de que o TGF- β poderia:

- (1) ser ativado na superfície da célula hospedeira a partir de TGF- β latente, mecanismo este mediado pelo parasito;
- (2) induzir sinalização via receptores de TGF- β da célula hospedeira, favorecendo assim a invasão celular e;

(3) ser captado e estocado intracelularmente pelos parasitos, participando do processo de diferenciação de formas amastigotas para tripomastigotas.

Outro importante aspecto a se considerar é a correlação entre o aumento dos níveis de TGF- β com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica aguda e crônica. Araujo-Jorge e cols (2002) mostraram uma relação entre a exacerbação dos níveis plasmáticos e da ativação da via de sinalização celular de TGF- β com a evolução da doença. De fato, o TGF- β é classicamente uma molécula indutora de processos fibróticos, que é uma das manifestações mais significativas da CCC (Andrade e cols, 1989; Rossi e Bestetti, 1995; Rossi, 2001). Dessa forma, TGF- β estaria atuando ativamente no desenvolvimento da doença, pois participa da produção de proteínas da matriz extracelular e conseqüente fibrose.

Além disso, TGF- β pode modular outras manifestações cardíacas, incluindo a proliferação e/ou morte dos cardiomiócitos. A sinalização por TGF- β está relacionada à hipertrofia dos cardiomiócitos dependente da estimulação pelo receptor β 1-adrenérgico (Rosenkranz, 2004), que pode amplificar a hipertrofia após o infarto, induzindo a transição entre hipertrofia adaptativa e hipertrofia compensatória.

Nosso grupo demonstrou que o bloqueio da via de sinalização intracelular de TGF- β nas células hospedeiras, pela ação do inibidor de T β RI, SB-431542, é capaz de inibir a invasão de *T. cruzi* e induzir um retardo na proliferação de formas amastigotas e na diferenciação destas formas em tripomastigotas. Estes dados sugerem mais uma vez o envolvimento de TGF- β no ciclo de vida do *T. cruzi* (Waghabi e cols, 2007).

A atividade do TGF- β foi também demonstrada em modelo experimental de infecção *in vivo*. Neste estudo, foi observada uma redução na parasitemia, na mortalidade, na presença de infiltrados inflamatórios e carga parasitária cardíaca de animais infectados pelo *T. cruzi* e tratados com SB-431542, na fase aguda da infecção (Waghabi e cols, 2009a). Entretanto, este estudo não investigou o potencial de reversão do processo fibrótico no miocárdio dos animais infectados e tratados com este inibidor.

É importante ressaltar que a patologia da cardiopatia chagásica envolve tanto as lesões diretamente provocadas por *T. cruzi*, como pelos mecanismos inflamatórios. Assim, uma resposta imune exacerbada pode ser prejudicial ao tecido cardíaco, sendo, portanto fundamental o equilíbrio entre as diferentes

citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Lannes-Vieira, 2009). Dessa forma, como TGF- β desempenha várias funções, sendo importante tanto para a manutenção do parasito por sua atuação anti-inflamatória, quanto para o desenvolvimento da doença por ser um grande indutor de fibrose, esta citocina é uma importante molécula a ser considerada como alvo para a terapia da doença de Chagas.

1.8 TGF- β como alvo para o tratamento da fibrose

A redução da expressão ou da atividade de citocinas através do uso de receptores solúveis ou anticorpos neutralizantes se revelou uma estratégia bem sucedida, como por exemplo a inibição do TNF- α para a terapia de doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide (revisto por Maruotti e cols, 2011). Uma abordagem semelhante tem sido proposta para o bloqueio da expressão e função de TGF- β . Algumas das estratégias anti-TGF- β sob investigação incluem o uso de anticorpos neutralizantes, de receptores solúveis, de técnicas moleculares como a interferência de RNA (RNAi) ou o bloqueio de sua via de sinalização através da inibição de seus receptores ou das SMADs (revisto por Varga e Pasche, 2008).

Os anticorpos neutralizantes inibem diretamente o ligante e evitam a ativação do receptor, e foram bem sucedidos em diversos modelos animais de fibrose (McCormick e cols, 1999). Os dados mostraram que o tratamento alongo prazo de ratos e camundongos com anticorpo monoclonal para o TGF- β parece ser bem tolerado, e é capaz de impedir o desenvolvimento da fibrose renal (McCormick e cols, 1999; Ziyadeh e cols, 2000; Fukasawa e cols, 2004). Em um modelo de camundongos mutantes para fibrilina-1, identificados na síndrome de Marfan (onde existe um aumento da sinalização de TGF- β em diversos órgãos como pulmões, coração e artérias), o uso de anti-TGF- β diminuiu as manifestações pulmonares e cardíacas (Neptune e cols, 2003). O uso de receptores solúveis que mimetizem os T β Rs, também tem se mostrado bastante promissor. Um exemplo é o uso de T β R3 solúvel que se mostrou eficaz na prevenção de diabetes e fibrose renal em um modelo com ratos diabéticos (Juarez e cols, 2007).

A utilização de técnicas moleculares como o RNAi para reduzir a expressão de TGF- β está se tornando clinicamente aplicável. Essa abordagem consiste na transfecção de células com sequências de RNAi (catalisadores da clivagem

enzimática de RNA) levando a inibição da tradução de TGF- β . Recentes estudos pré-clínicos com alvo para TGF- β , demonstraram a eficácia antifibrótica do RNAi em modelos de ratos com cirrose hepática (Hwang e cols, 2006) e com fibrose peritoneal (Liu e cols, 2007). Nesses estudos com roedores, a administração de RNAi diminuiu o acúmulo de colágeno e a transformação de miofibroblastos nos órgãos-alvo.

Como a resposta a TGF- β é mediada por receptores através da atividade do domínio serina / treonina-cinase, a inibição do receptor resultaria na inibição da atividade biológica deste mediador. Assim, pequenas moléculas poderiam se ligar ao domínio cinase ligante de ATP de T β RI ou T β RII, evitando a fosforilação do substrato e impedindo a ativação das SMAD-R. Muitas moléculas que se ligam ao domínio cinase dos receptores têm sido desenvolvidas por diversos laboratórios, como: SB431542 (GlaxoSmithKline, King of Prussia, Pennsylvania, USA), SD-208 (Scios Inc., Mountain View, California, USA) e SM305 (Biogen-Idec, Cambridge, Massachusetts, USA) e têm se mostrado eficazes em reduzir a transição epitélio-mesenquima (Tojo e cols, 2005), a diferenciação de miofibroblastos (Mori e cols, 2004; Ishida e cols, 2006) e a estimulação da expressão de componentes de matriz extracelular mediados por TGF- β .

Em diferentes modelos animais de fibrose, o uso de pequenas moléculas inibidoras do T β RI demonstraram-se eficazes na prevenção de fibrose renal (Moon e cols, 2006), hepática (de Gouville e cols, 2005; Fu e cols, 2008) e pulmonar (Bonniaud e cols, 2005). Em 2006, a atividade e o perfil farmacocinético de muitos destes compostos foram testados e um novo inibidor, altamente seletivo e oralmente ativo, o GW-788388 foi identificado (Gellibert e cols, 2006).

Este novo composto além de apresentar um bom perfil farmacocinético (meia vida de eliminação de 1,3 horas e baixo “clearance” plasmático - 20 ml/min/kg em ratos) se mostrou capaz de bloquear, *in vitro*, a atividade de ambos T β RI e T β RII (Petersen e cols, 2008). GW-788388, quando administrado por via oral, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de reduzir significativamente a expressão de RNAm de fatores críticos para o remodelamento da matriz extracelular como: colágeno I, colágeno III e PAI-1 (inibidor de ativação de plasminogênio 1) em diferentes modelos de fibrose hepática e renal (Gellibert e cols, 2006; Petersen e cols, 2008). Recentemente, foi observado que GW-788388

também é capaz de atenuar a disfunção e a insuficiência cardíaca, provocadas pelo remodelamento cardíaco em um modelo de infarto agudo do miocárdio em ratos, reduzindo assim o risco de morte dos animais (Tan e cols, 2010).

Com relação à infecção por *T. cruzi*, os dados *in vitro* e *in vivo* de bloqueio da via de sinalização de TGF- β (Waghabi e cols, 2007 e 2009a), estimularam a análise do efeito de GW-788288 sobre a infecção aguda experimental por este parasito, visando analisar uma possível redução e/ou reversão do processo fibrótico cardíaco característico na doença de Chagas. Nosso estudo visa contribuir para a hipótese de que no futuro o uso de inibidores da via de sinalização de TGF- β ou o uso de anticorpos que neutralizem a função desta citocina, possam minimizar os danos cardíacos dos pacientes chagásicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o efeito do inibidor da atividade de TGF- β , GW-788388, no curso da infecção aguda experimental pelo *T. cruzi*, em especial quanto aos processos fibrinogênicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Testar o efeito de GW-788388 sobre os aspectos parasitológicos e clínicos, incluindo: parasitemia, sobrevida, curva ponderal, ECG, histopatologia cardíaca (inflamação e carga parasitária) e hepática (inflamação) e marcadores de lesão hepática e renal, em camundongos no curso da infecção aguda experimental pelo *T. cruzi*;
- ✓ Analisar a expressão de proteínas de matriz extracelular (colágeno e fibronectina) nos corações de camundongos infectados pelo *T. cruzi* tratados ou não com GW-788388;
- ✓ Analisar a expressão da proteína conexina 43 no tecido cardíaco durante a infecção aguda experimental pelo *T. cruzi* em camundongos tratados ou não com GW-788388;
- ✓ Analisar a expressão de óxido nítrico no plasma de animais infectados pelo *T. cruzi* submetidos ou não ao tratamento com GW-788388.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo Experimental

3.1.1 Parasitos:

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi* (Silva & Nussenzweig, 1953). Formas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas a partir de camundongos *Swiss Webster* infectados com 10^5 parasitas/animal após 7 dias de infecção (pico da parasitemia). Estas formas foram isoladas por centrifugação diferencial: i) 165 g / 20 min para separar eritrócitos e leucócitos; ii) 270 g / 15 min para sedimentar os parasitos. A seguir os parasitos foram ressuspensos durante 20 min a 37 °C em Meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) com 20% de soro fetal bovino para aglutinar as plaquetas. Após centrifugação a 270 g/15 min, os parasitos foram ressuspensos em tampão fosfato [0,01 M pH 7,2 com 0,85% de NaCl (PBS)] (Araújo-Jorge e cols, 1989).

3.1.2 Animais:

Camundongos machos da linhagem *Swiss Webster*, com 6-8 semanas de idade, pesando de 18 a 20g, foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL). Os animais foram separados em grupos de 5 a 8 por gaiola, mantidos no Setor de experimentação animal do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, em condições estáveis de temperatura e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro em estantes ventiladas, alimentados com comida autoclavada e água filtrada a vontade. Todos os ensaios foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (Protocolo CEUA: L0028/09).

3.1.3 Infecção *in vivo*:

Após uma semana de permanência e adaptação no Setor de experimentação animal, os camundongos foram infectados por injeção intraperitoneal de 100 µl de suspensão de formas sanguíneas do *T. cruzi* em meio DME na concentração de 10^4 parasitas/animal. Para cada análise experimental foram realizados o mínimo de 3 ensaios.

3.2 Composto e tratamento:

3.2.1 Composto:

O composto antifibrinogênico utilizado foi o GW-788388 (4-{4-[3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]pyridin-2-yl}-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl) benzamide) (Fig. 3.1) produzido pela GlaxoSmithKline Pharmaceuticals e gentilmente cedido pela Dra. Anne-Charlotte de Gouville. Este composto, atua inibindo a via de sinalização de TGF- β , pois é um inibidor competitivo do sítio de ligação de ATP de ambos os receptores de TGF- β , T β RI e T β RII, conforme mostra a figura 3.2.

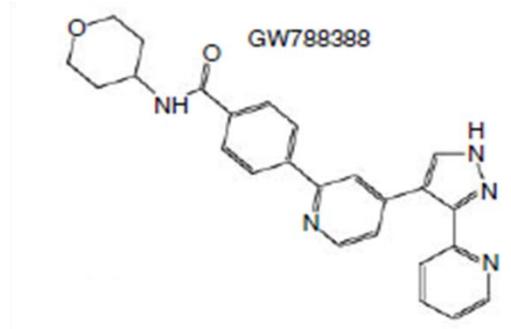


Figura 3.1: Estrutura química do composto GW-788388, inibidor do receptor de TGF- β (Imagem adaptada de Petersen e cols, 2008).

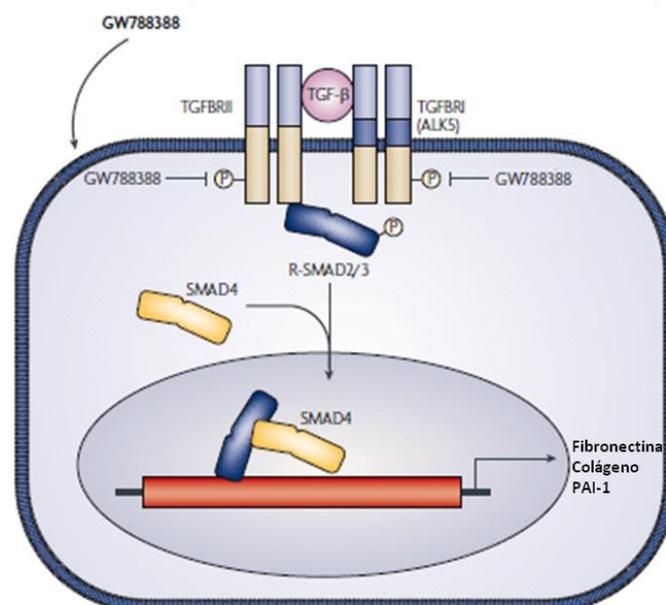


Figura 3.2: Atuação do composto GW-788388 sobre a via de TGF- β (Imagem adaptada de Perico e cols, 2008).

3.2.2 Esquemas de tratamento:

Os animais foram tratados via intraperitoneal ou via oral (*gavage*) com GW-788388, na concentração de 3mg/kg/camundongo, em dose única, de acordo com o estabelecido por Gellibert e cols (2006). A solução estoque do composto, 20mg/ml, foi preparada em tampão contendo 5% Tween 20, 20% HCl e 1M NaH₂PO₄. A cada dia de administração do composto foi preparada a solução trabalho diluída em água filtrada e cada animal recebeu 200µl da solução diluída.

3.2.3 Grupos experimentais:

Os animais foram divididos em grupos de no mínimo 8 animais, conforme descrito na Tabela 3.1. Somente animais com parasitemia positiva foram mantidos no estudo.

Tabela: 3.1 - Grupos Experimentais

NI*	Animais não infectados
Y	Animais infectados e não tratados
Y+ GWd3	Animais infectados e tratados com GW-788388 no 3º dia após a infecção
Y + GWd13	Animais infectados e tratados com GW-788388 no 13º dia após a infecção
Y + GWd20	Animais infectados e tratados com GW-788388 no 20º dia após a infecção

* NI = não infectado

3.3 Parasitemia, curva ponderal e sobrevida:

Os níveis de parasitemia foram acompanhados no período de 6 a 22 dias pós-infecção (dpi) através da contagem dos parasitas ao microscópio ótico (aumento de 400x). Para tanto foram retirados 5µl de sangue periférico da cauda de cada animal e a contagem feita em 50 campos focais, segundo a técnica descrita por Brener (1962).

Para obtenção da curva ponderal, o peso dos camundongos foi acompanhado semanalmente, sendo determinado no dia da infecção e nos 8º e 15º dpi. O resultado foi expresso como média±desvio padrão por grupo experimental. A mortalidade foi acompanhada diariamente até o 30º dpi para cálculo do percentual de sobrevida dos animais.

3.4 Eletrocardiograma (ECG):

Os animais dos diferentes grupos foram submetidos ao ECG no 15° ou 24° dpi para verificação de possíveis alterações de condução elétrica e danos cardíacos. Para obter os traçados eletrocardiográficos, os transdutores foram colocados sob a pele do animal, de acordo com a derivação desejada (DII). Os traçados foram obtidos através de um sistema digital *Power Lab 2/20* acoplado a um bioamplificador com captação de sinais em 2 mV por 1 segundo. Os filtros foram padronizados entre 0,1 e 100 Hz e os traçados foram visualizados e analisados no software *Scope for Windows V3.6.10*. Os parâmetros eletrocardiográficos avaliados foram: frequência cardíaca (bpm) e duração dos intervalos PR, QRS e QT em milissegundo (ms).

3.5 Coleta de plasma:

Em tubos de 1,5 ml heparinizados foram coletados cerca de 400µl de sangue da cauda do camundongo antes da infecção e em diferentes dpi (8°, 15° e 24°), possibilitando a análise cinética individual dos níveis de óxido nítrico (NO), nos diferentes grupos de animais testados. O plasma foi obtido após centrifugação do sangue e congelado à -70°C até a análise.

3.6 Coleta de tecidos:

No 15° e 24° dpi, 3 animais de cada grupo experimental foram eutanaziados em câmara de CO₂ para imediata retirada dos corações e fígados. Estes órgãos foram lavados em PBS e clivados ao meio, sendo uma parte fixada em solução de Milloning-Rosman (10% Formaldeído em PBS) para análise histológica e a outra congelada em nitrogênio líquido e mantida a -70°C para posterior extração de proteínas.

3.7 Análise histopatológica:

Após fixação, os órgãos foram desidratados e embebidos em parafina. Cortes histológicos de 3µm de espessura foram corados por tricrômica de Masson e analisados ao microscópio ótico (30 campos/aumento de 400X), para quantificação do número e tamanho de infiltrados inflamatórios (mínimo 10 células mononucleares), da carga parasitária tecidual (número de ninhos de amastigotas) e

presença de fibrose nos tecidos observada pela deposição de colágeno, evidenciada pela coloração azul claro.

O tamanho dos infiltrados inflamatórios foi analisado de acordo com o número de células inflamatórias que o compõem: i) pequenos infiltrados (entre 10 e 20 células); ii) infiltrados médios (entre 21 e 50 células) e; iii) grandes infiltrados (mais que 50 células).

Os cortes corados com tricrômica de Masson também foram utilizados para determinar a localização e o grau da fibrose cardíaca. Os tecidos foram observados ao microscópio ótico (aumento de 40X) e o grau de fibrose caracterizado conforme a Tabela 3.2. Foram atribuídos valores de acordo com a extensão da área marcada para colágeno, determinando o grau da fibrose que variou de 0 a 3.

Tabela 3.2 Classificação da fibrose conforme extensão de área marcada para colágeno

Deposição de colágeno	Extensão de marcação para colágeno	Grau da fibrose (Score)
Normal	-	0
Leve	+	1
Moderada	++	2
Intensa	+++	3

3.8 Imunohistologia:

Foram realizadas reações imunohistológicas para observação *in situ* da deposição dos componentes de matriz extracelular (colágeno tipo I e fibronectina) e da expressão de Cx43 foram analisados utilizando os seguintes anticorpos policlonais desenvolvidos em coelho: anti-Colágeno I (Novotec, França), anti-Fibronectina (F3648; Sigma) e anti-Cx43 (C6219; Sigma).

Para o procedimento imunohistológico, a partir de corações emblocados em parafina, foram obtidos cortes com 3µm de espessura, aderidos sobre lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina e mantidos em estufa a 40°C até sua utilização. Posteriormente, as amostras foram submetidas à bateria de retirada da parafinina em três banhos de xilol 100% (10 min cada), seguida de lavagens (3 min) para reidratação em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70%, 50%) e H₂O destilada. Após a reidratação, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas pela solução 3% BSA (albumina bovina) em PBS por 1h. Após este

período foi realizada a recuperação antigênica, em tampão citrato de sódio (10mM, pH 6), no forno de microondas à 750W por 5min. Após 3 lavagens (10min) em água destilada, foi realizado um segundo bloqueio, incubando as amostras por 1h com soro normal de cabra (animal em que foram obtidos os anticorpos secundários) diluído 1:500, em solução 3% BSA em PBS. Em seguida, as amostras foram incubadas por 18 horas a 4°C com os anticorpos primários anti- colágeno tipo I (1:500), fibronectina (1:500) e anti-Cx43 (1:1000) diluídos em solução de bloqueio, por cerca de 18h, à 4°C. Os cortes foram lavados por 3X (10min) em solução 1% BSA em PBS e submetidos à reação com os anticorpos secundários anti- imunoglobulina de coelho (1:500) por 1h, à temperatura ambiente (Alexa-594 para fibronectina e colágeno e Alexa-488 para Cx43). Após 3 lavagens (10min) em solução 1% BSA em PBS o material foi incubado para marcação do DNA (núcleo) com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) por 10 minutos, diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Em seguida, as lâminas foram lavadas com 1% BSA/PBS (10 min), montadas em 1, 4-diazabicyclo-(2, 2, 2)-octano (DABCO) e mantidas a 4°C até análise por microscopia de epifluorescência e de varredura confocal a laser (Plataforma de Microscopia Confocal – RJ/ PDTIS).

3.9 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Para a dosagem de NO plasmático durante a cinética de infecção (8°, 15° e 24° dpi), o plasma de 3 animais de cada grupo experimental foi submetido ao ensaio *Nitric Oxide Colorimetric Assay* (Roche AppliedScience®). A quantificação feita por este ensaio é baseada nos produtos da reação de oxidação de NO: nitrato e nitrito.

O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o plasma foi diluído na razão 1:1 em PBS, volume final de 600µl, e proteínas de baixo peso molecular foram concentradas por centrifugação em colunas contendo filtros de 10kDa (Millipore) por 45min à 1250g. Em seguida, as proteínas foram aplicadas em duplicata (150µl por poço), na placa de 96 poços, seguindo o protocolo do fabricante. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro com leitor de placas à 550nm e a curva padrão foi elaborada utilizando concentrações conhecidas de nitrato de potássio que variaram de 0,25µM a 80 µM.

3.10 Dosagem de transaminases hepáticas e uréia

Para esses ensaios cerca de 100µl do sangue de 10 animais de cada grupo experimental foram obtidos no 15° e 24° dpi, para avaliação dos indicadores de dano hepático (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST); e dano renal (uréia). Estes parâmetros foram avaliados através de testes Reflotron.

3.11 Extração e dosagem de proteínas

Para o preparo de extratos de proteínas cardíacas, o tecido coletado foi pesado e adicionado 1 ml do tampão de extração (NaCl 0,4M / 0,05% Tween 20 / 1% *cocktail* de inibidores de protease (Sigma) / 0,5% PMSF 2mM / PBS) a cada 100mg de tecido. Em seguida, ainda no tampão, o material foi lisado mecanicamente por ultra-som, passando por 3 ciclos de 1min ultra-som e 1min gelo e armazenado a -70°C até a realização do ensaio.

A dosagem de proteínas foi realizada pelo Kit de dosagem RCDC – BioRad® (método modificado de Lowry e cols, 1951). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 750nm e a curva padrão foi elaborada utilizando concentrações conhecidas de albumina bovina (BSA) que variaram entre 0,2 mg/mL a 1,4 mg/mL.

3.12 Eletroforese

Para este ensaio, 20 µg de proteínas cardíacas de cada animal foram adicionadas a um volume final de 10µl de tampão de amostra (62,5mM Tris-HCl, 2%SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,002% azul de bromofenol). A mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 12% [0,375M Tris-HCl pH 8,8; 30% acrilamida/ 0,8% bis-acrilamida 12%; 0,1% SDS (Dodecil sulfato de sódio); 0,1% persulfato de amônio e 0,01% TEMED] em tampão de corrida Laemmli (24,6mM Tris base, 192mM Glicina, 3,48 mM SDS; Laemmli, 1970) à 200V.

3.13 Transferência

Seguida a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, GE), em tampão de transferência (25 mM Tris base, 192 Glicina mM, 20% etanol), à 100V, durante 1 hora à 4°C. Logo após, a membrana foi corada com kit de coloração reversível, MemCode TM Reversible Protein Stain® (Pierce), para a visualização da eficiência da transferência de proteínas. Posteriormente, foi feita a saturação protéica da membrana utilizando-se uma solução de 5% de leite desnatado em TBS-T (Tris 100mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,1% Tween 20) durante aproximadamente 16 horas a 4 °C.

3.14 Western blot

Após o período de saturação, a membrana foi lavada 2X em TBS-T (5 min). Em seguida, foi incubada com o anticorpo primário diluído em 5% leite em TBS-T (Tabela 3.3) por 2h, sob leve agitação, à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada 2X em TBS-T e 2X em TBS (Tris 100mM pH 7,4, NaCl 150 mM) por 5 min. Em seguida foi incubada por 1h, protegida da luz, com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou de camundongo acoplado a peroxidase (Pierce) diluído na solução de saturação (Tabela 3.4). Finalizado o período de incubação, a membrana foi lavada 2X em TBS-T e 2X em TBS (5min), e a imunomarcação revelada por incubação (5min) com solução de revelação SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida exposta ao filme em diferentes tempos, revelada e fixada em soluções Kodak GBX®.

Tabela 3.3 Anticorpos primários

Anticorpo primário	Fabricante	Diluição
Anti-Fibronectina (F3648)	Sigma	1:2000
Anti-Colágeno I	Novotec	1:5000
Anti-Cx43 (C6219)	Sigma	1:10000
Anti-GAPDH* (MA1-16783)	ABR	1:10000

*Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase

Tabela 3.4 Anticorpos secundários

Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Diluição do 2º anticorpo
Anti-Fibronectina	Anti-coelho-HRP	1:20000
Anti-Colágeno I	Anti-coelho-HRP	1:20000
Anti-Cx43	Anti-coelho-HRP	1:50000
Anti-GAPDH	Anti-camundongo-HRP	1:10000

3.15 Captura em formato digital e quantificação da expressão de proteínas

Foi utilizado o GS-800 Calibrated Densitometer (BIORAD) para obtenção das imagens em formato digital e o programa Quantity One® (BIORAD) para análise das imagens e quantificação da expressão das proteínas de acordo com o volume de pixels de cada banda identificada. A quantificação da expressão das diferentes proteínas (referentes a cada banda reconhecida pelos anticorpos) foi feita com base na razão WB/GAPDH (razão entre o valor do volume de pixels totais de cada banda e o valor do volume de pixels da banda encontrada para a proteína constitutivamente expressa GAPDH), visando a normalização dos valores obtidos.

3.16 Análises estatísticas:

Os resultados obtidos foram avaliados por testes estatísticos com auxílio do software GraphPad Prism versão 4, utilizando-se o método mais adequado para cada tipo de avaliação: Kaplan Meier para avaliação de sobrevida e teste Mann-Whitney para as demais análises. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (*) e $p < 0,001$ (**).

4. RESULTADOS

4.1 Escolha do esquema de tratamento com GW-788388

A escolha do esquema de tratamento foi baseada: 1) na determinação da concentração de uso seguindo os ensaios de dose- resposta, desenvolvidos por Gellibert e cols (2006), nos quais concentrações a partir de 3,0 mg/kg/camundongo foram capazes de bloquear a atividade de TGF- β ; 2) na escolha da administração do composto em dose única conforme estudos anteriores do grupo (Waghbi e cols, 2009a e dados não publicados) e; 3) as vias de administração oral (Gellibert e cols, 2006) e intraperitoneal (Waghbi e cols, 2009a) para análise comparativa da melhor via de administração. Conforme Waghbi e cols 2009a, iniciamos os estudos com tratamento no 3^o dpi (**Tratamento I**) objetivando a inibição do desenvolvimento da fibrose cardíaca. Estendendo esta avaliação para períodos mais tardios da infecção, 13^o dpi (**Tratamento II**) e 20^o dpi (**Tratamento III**) visando reverter processos fibróticos já instalados.

Baseando-se no esquema de **Tratamento I**, as duas vias de administração foram comparadas avaliando-se a parasitemia e o percentual de sobrevivência dos animais. Observou-se que o composto reduziu, significativamente ($p < 0,05$), em 69%, os níveis de parasitemia no 8^o dpi (pico de parasitemia), independente da via administrada. Em contrapartida, o percentual de sobrevivência dos animais que receberam o tratamento oral foi de cerca de 80% enquanto que os animais que receberam o tratamento via intraperitoneal alcançaram apenas 62% (Figura 4.1A e B). A partir desse resultado, adotamos como rota de administração o tratamento oral (*gavage*).

4.2 Tratamento I: 3^o dia após a infecção por *T. cruzi*

4.2.1 Acompanhamento dos níveis de parasitemia, sobrevivência e peso dos animais

Conforme mostrado na Figura 4.2, a inibição da via de sinalização de TGF- β no 3^o dpi, levou a uma significativa redução nos níveis de parasitemia de cerca de 56% (Figura 4.2A) e a um aumento de 40% na sobrevivência dos animais (Figura 4.2B) em relação ao grupo não tratado ($p < 0,05$). A curva

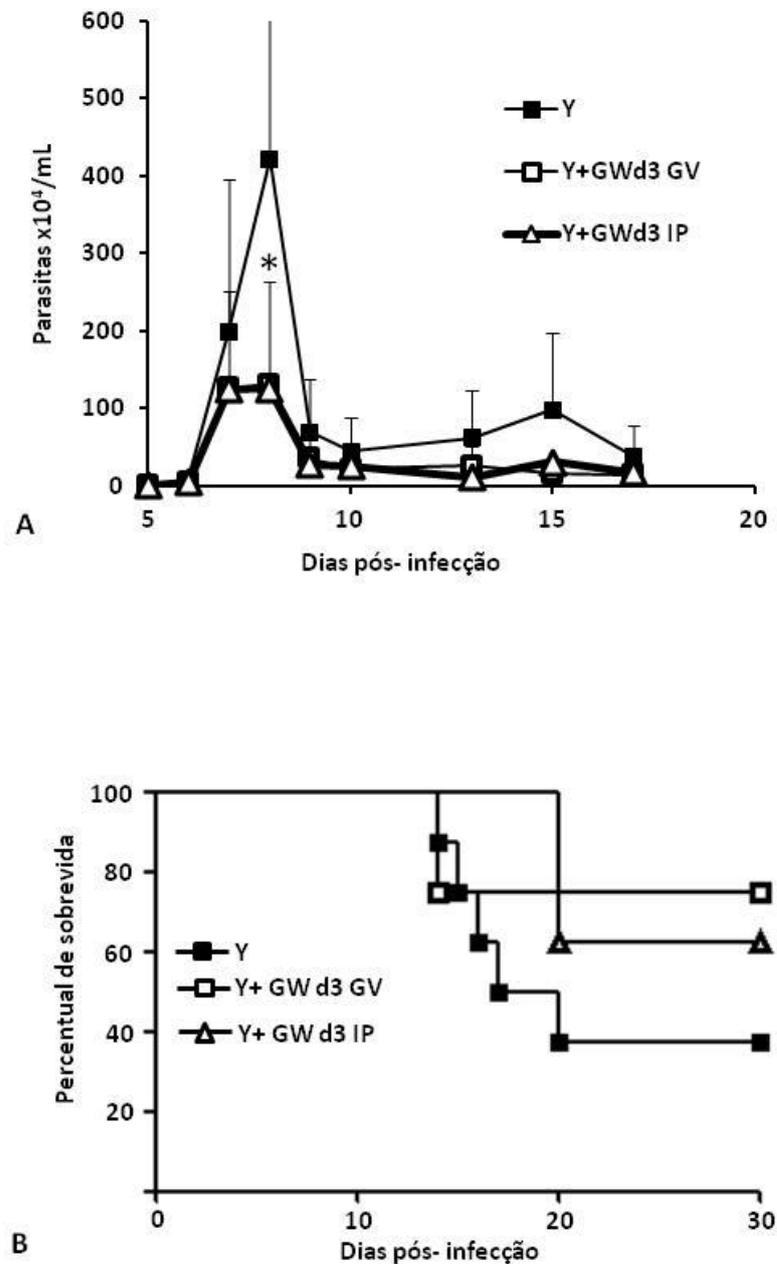


Figura 4.1: Efeito do tratamento com GW-788388 no 3º dpi, administrado por *gavage* (GV) ou pela via intraperitoneal (IP) em camundongos infectados pelo *T. cruzi*: (A) cinética de parasitemia e (B) percentual de sobrevivência dos animais infectados não tratados (Y) e tratados por *gavage* (Y+ GW d3 GV) e dos tratados pela via intraperitoneal (Y+ GW d3 IP). Asterisco indica diferença significativa dos grupos tratados em relação ao grupo não tratado* $p < 0,05$ ($n = 8$ animais por grupo).

ponderal mostrou, que a infecção levou a uma significativa perda de massa corporal nos animais infectados não tratados e que o composto não foi capaz de recuperar esta perda (Figura 4.2C).

4.2.2 Efeito do composto no parasitismo e inflamação no tecido cardíaco

Para investigar se o esquema de **Tratamento I** reduz a carga parasitária e o influxo de células inflamatórias no coração dos animais infectados e tratados, foi realizada análise histológica do tecido cardíaco no 15^o dpi. Os resultados obtidos revelaram uma dissociação das fibras cardíacas, provavelmente relacionada ao grande número de ninhos de amastigotas (Figura 4.3A e B, setas vazadas) e à intensa migração de células inflamatórias (Figura 4.3C e D, setas cheias) nos tecidos avaliados.

Observamos que o tratamento reduziu significativamente ($p < 0,05$) em 55,4% o número de ninhos de amastigotas (Figura 4.3E) em relação ao grupo não tratado. Esse decréscimo no número de parasitas intracelulares mostrou-se em conformidade com a diminuição do número de parasitas circulantes (Figura 4.2A).

Além disso, o tratamento reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número total de infiltrados inflamatórios, exibindo valores de $168,5 \pm 45 \times 10^4 / 30$ campos nos tecidos de animais infectados não tratados e de $94,7 \pm 29,3 \times 10^4 / 30$ campos nos tratados, representando uma queda de 43,8% (Figura 4.3F). Objetivando avaliar diferenças entre o número total e o tamanho dos infiltrados observados e correlacioná-las ao efeito do tratamento, os infiltrados foram classificados de acordo com o número de células: pequeno (10-20 células); médio (21-50 células) e grande (acima de 50 células). Nossos dados demonstraram que o grupo de animais tratados apresentou uma grande redução de 3 e 6 vezes no número de infiltrados médios ($p = 0,002$) e grandes ($p = 0,004$), respectivamente, em comparação com o grupo não tratado. Não foi observada diferença significativa no número de pequenos infiltrados inflamatórios que apresentavam de 10 a 20 células (Tabela 4.1).

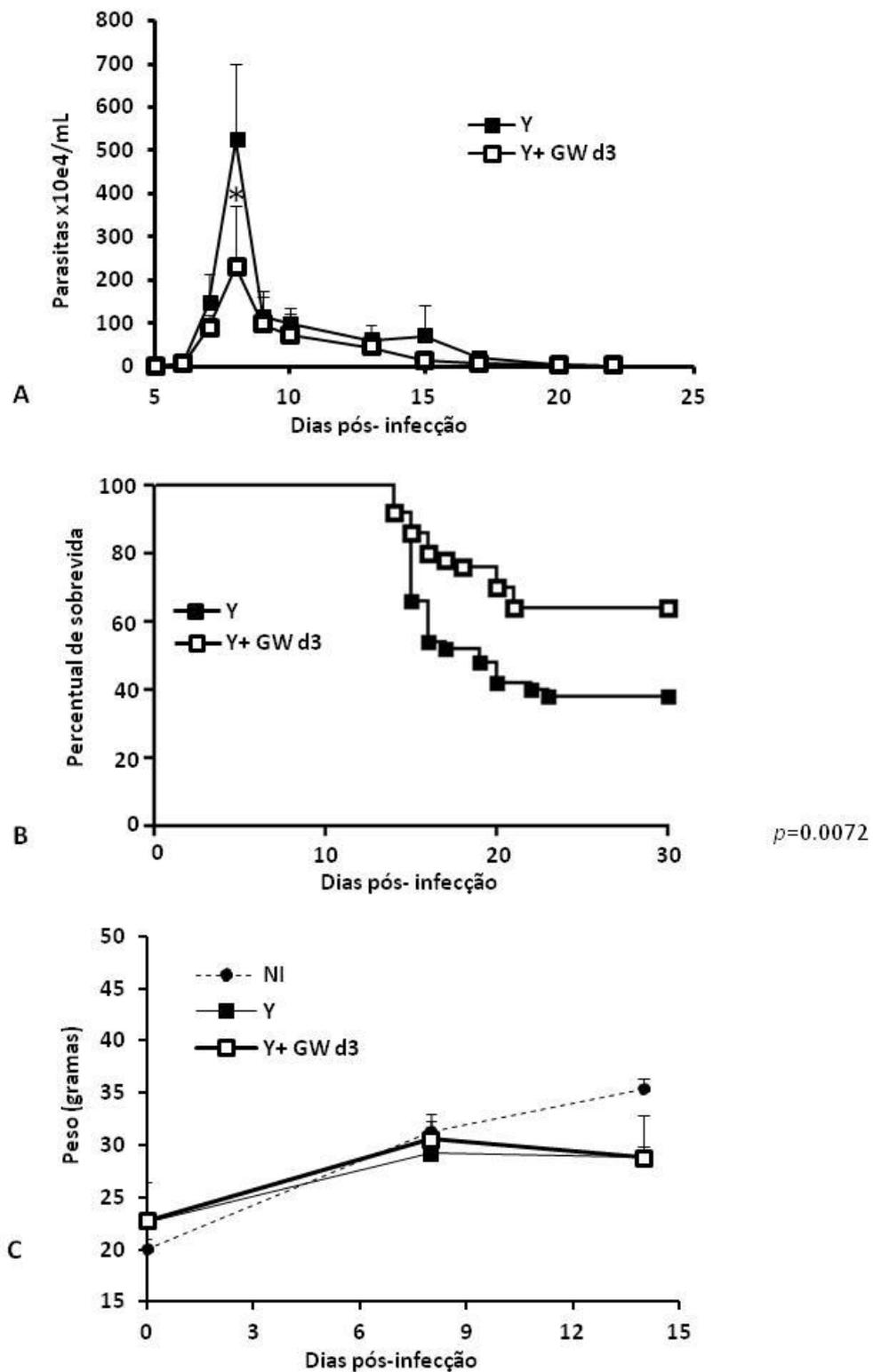


Figura 4.2: Efeito do tratamento com GW-788388 no 3º dpi, administrado por *gavage* em camundongos infectados pelo *T. cruzi*: (A) cinética de parasitemia, (B) percentual de sobrevivida e (C) curva ponderal dos animais não infectados (NI), infectados não-tratados (Y) e tratados (Y+GW d3). Os dados representam média \pm desvio padrão de no mínimo de 8 animais por grupo em 5 experimentos independentes (n=64 animais por grupo).

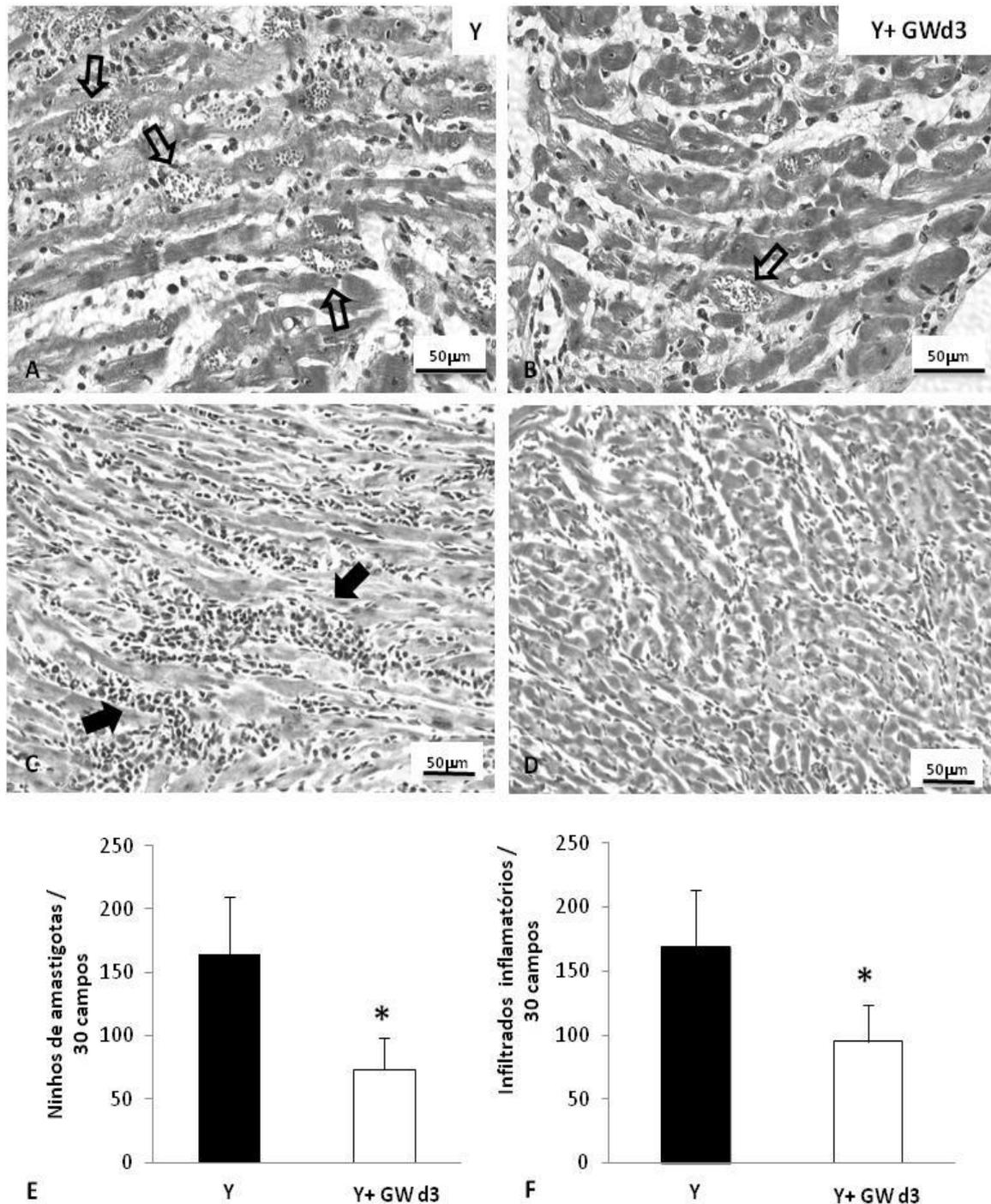


Figura 4.3: Achados histopatológicos no 15^o dpi do coração de animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados com GW-788388 no 3^o dpi: (A) ninhos de amastigota nos tecidos cardíacos dos animais não tratados e (B) tratados (Aumento 400X, setas vazadas); (C) infiltrados inflamatórios nos corações dos animais não tratados e (D) tratados (Aumento 200X, setas cheias); gráficos do número médio (E) de ninhos de amastigota em 30 campos e (F) de infiltrados inflamatórios em 30 campos dos animais não tratados (Y, barra preta) e tratados (Y+ GW d3, barra branca). Os gráficos representam média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. Asterisco indica diferença significativa do grupo tratado em relação ao grupo não tratado, * = $p < 0,05$. Barra = 50mm. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

Tabela 4.1 Número de células inflamatórias por infiltrado no coração de animais infectados pelo *T. cruzi* (15º dpi) e submetidos ao Tratamento I

Número de células/ infiltrado inflamatório	Y	Y+ GW d3	Índice de queda	p valor
10-20	73,17 ± 28,18	65,83 ± 18,25	1,10	0,68
21-50	66 ± 19,67	24 ± 10,54	2,75	0,002
>50	29,33 ± 18,74	4,83 ± 2,9	6,07	0,004
Total	168,5 ± 45	94,67 ± 29,34	1,78	0,008

4.2.3 Ação do composto em órgãos secundários

Além do tecido cardíaco, foi investigado pela análise histológica no 15º dpi, o fígado dos animais tratados ou não, de acordo com o esquema de **Tratamento I**. A análise revelou a presença de infiltrados inflamatórios no tecido hepático dos camundongos infectados (Figura 4.4A e C) e o bloqueio da atividade de TGF- β reduziu, significativamente ($p < 0,05$), este processo inflamatório (Figura 4.4B e C). Ambas as transaminases ALT e AST são indicadores de danos hepáticos. A ALT é uma enzima do citoplasma de hepatócitos cujo aumento no sangue constitui um indicador de danos no fígado e a AST é uma enzima que se encontra nas mitocôndrias e no citoplasma de todas as células sendo a avaliação de sua atividade um procedimento básico para o diagnóstico e monitoramento de doenças hepáticas e/ou lesões musculares (revisto por Ozer e cols, 2008). Sendo assim, a fim de confirmar os danos observados histopatologicamente, analisamos esses parâmetros. Essa avaliação demonstrou que os animais infectados apresentaram um aumento significativo de 2,6 vezes nos níveis de AST e 4,6 vezes nos níveis de ALT em relação aos não infectados (Figura 4.4D e E, $p < 0,001$), indicando perda de função hepática.

Em contrapartida, o **Tratamento I** reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de AST e ALT plasmáticos. Observamos uma redução nos níveis médios de AST de $269,53 \pm 98,5$ mg/dL para $167,5 \pm 100,7$ mg/dL, representando uma queda de 38% e um decréscimo na média dos valores de ALT de $127,83 \pm 64$ mg/dL para $73,61 \pm 49$ mg/dL, representando 42% de redução (4.4D e E).

O rim foi o outro órgão de escolha para avaliação no 15º dpi, através da dosagem de ureia plasmática. Este marcador é comumente utilizado como indicador de dano renal quando presente em altas concentrações (revisto por

Lisowska-Myjak, 2010). Nossos dados revelaram que a infecção por *T. cruzi* induziu um aumento de 84% na quantidade de ureia ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle não infectado, indicando a ocorrência de lesão renal. No entanto, os níveis elevados de ureia em decorrência da infecção foram reduzidos em 41% nos animais infectados submetidos ao **Tratamento I** (Figura 4.4F, $p < 0,05$), evidenciando uma possível melhora da disfunção renal.

4.2.4 Efeito sobre a deposição de proteínas de matriz extracelular no tecido cardíaco

Na fase aguda da doença de Chagas, a miocardite pode estar associada a processos fibróticos focalizados (Andrade e cols, 1989; Andrade, 1999). Neste modelo experimental murino também foi constatada a presença de fibrose no coração dos animais infectados por *T. cruzi* ainda durante a infecção aguda experimental (Figura 4.5A e B). A análise da presença de fibrose foi realizada a partir da análise de proteínas de matriz extracelular no tecido cardíaco por técnicas como: coloração histológica por Tricrômica de Masson, imunohistologia e *Western Blot*.

Os cortes histológicos dos animais infectados corados pela técnica de Masson revelaram um aumento na deposição de colágeno, visualizado em azul claro, principalmente na região atrioventricular e na periferia dos vasos no 15^o dpi (Figura 4.5A e B). Observa-se ainda que os animais tratados apresentaram uma redução na deposição de colágeno em relação ao grupo não tratado no 15^o dpi (Figura 4.5B e C). A análise semi-quantitativa revelou um aumento de 8,8 vezes no grau de fibrose nos animais infectados em relação ao grupo controle e uma moderada inibição da deposição de colágeno frente ao **Tratamento I** (Figura 4.5D e Tabela 4.2).

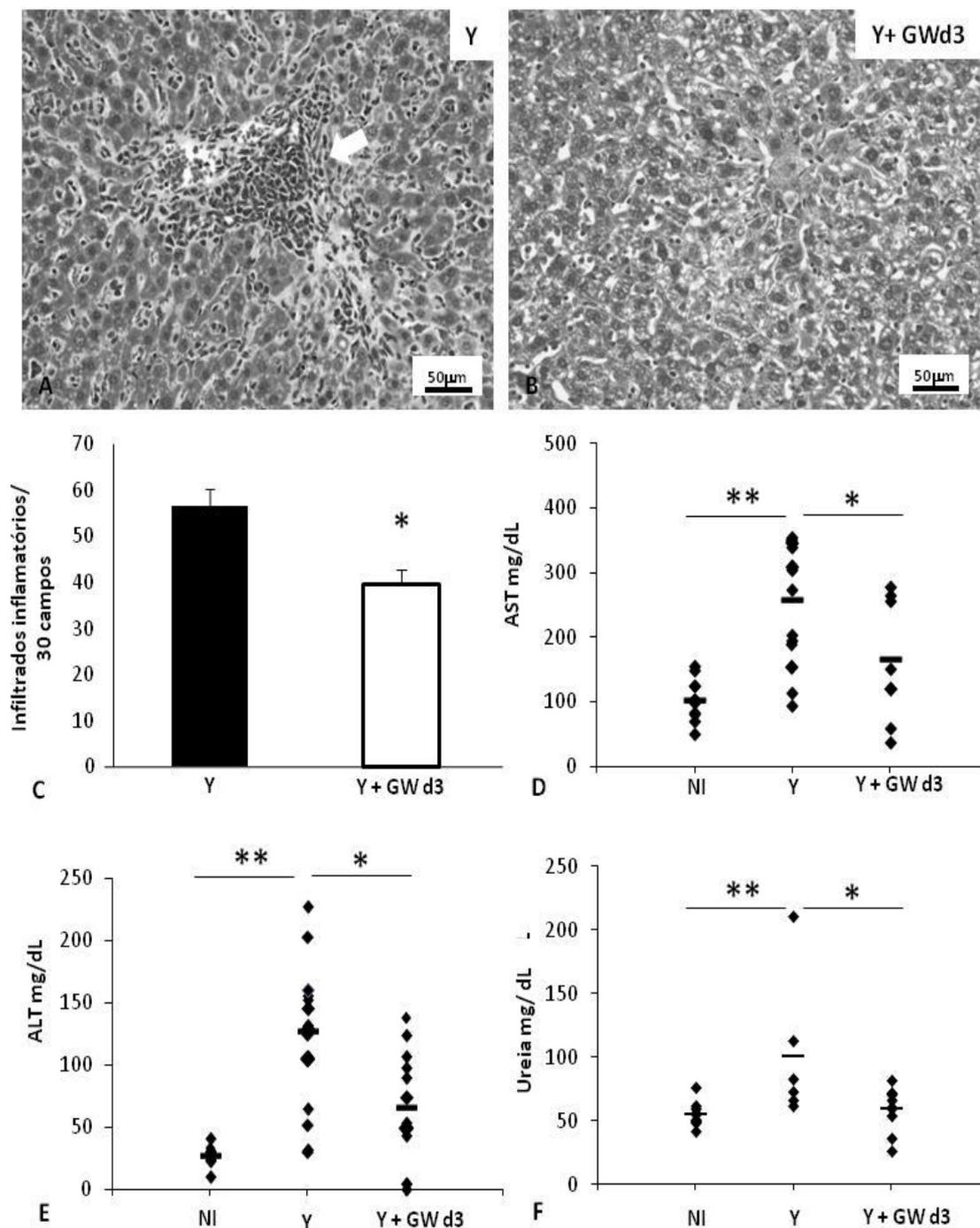


Figura 4.4 Achados histopatológicos no 15º dpi do fígado e dosagem de marcadores hepáticos e renal de animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados com GW-788388 no 3º dpi: (A) infiltrados inflamatórios no fígado dos animais não tratados e (B) tratados (Aumento 200X, setas cheias); (C) gráfico do número médio de infiltrados inflamatórios em 30 campos dos animais não tratados (barra preta) e tratados (barra branca); os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo). Gráficos representando valores individuais dos níveis plasmáticos das transaminases hepáticas (D) aspartatoamino transferase (AST) e (E) alaninamino transferase (ALT); e marcador de função renal (F) ureia em animais não infectados (NI), infectados não tratados (Y) e tratados (Y+ GW d3); os dados representam média \pm desvio padrão do mínimo de 8 animais por grupo. Asterisco indica diferença significativa entre os grupos, * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,001$. Barra= 50mm.

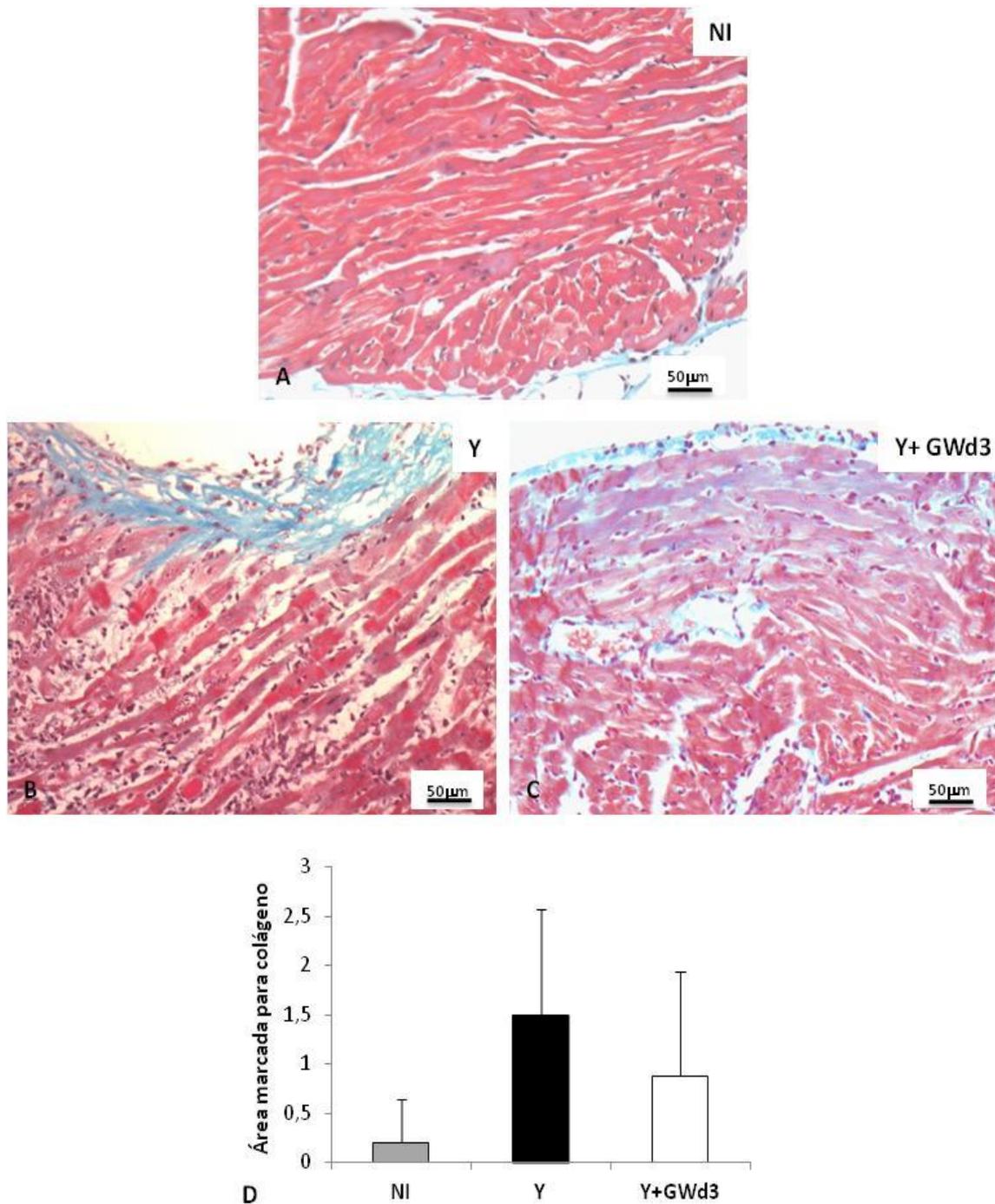


Figura 4.5 Amostras teciduais no 15^o dpi coradas pela técnica de Tricrômica de Masson para marcação de colágeno visualizado em azul claro (Aumento 200X). Foram obtidos corações de animais: (A) não infectados e infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e (B) não-tratados (Y) representação da deposição de colágeno no tecido cardíaco de animais A) não-infectados (NI), infectados ou (C) tratados (Y + GW d3) com GW-788388 no 3^o dpi; (D) Gráfico da média \pm desvio padrão representando o grau de deposição de colágeno de acordo com a extensão da área marcada nos animais não infectados (NI, barra cinza), infectados não tratados (Y, barra preta) e tratados (Y+GW d3, barra branca). Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

Tabela 4.2: Classificação individual do grau de deposição de colágeno de acordo com a extensão de área marcada no tecido cardíaco no 15º dpi

	NI	Y	Y+ GWd3
	-	++	-
	-	+	-
Extensão de área marcada	-	+++	-
	-	++	++
	+	-	-
		++	-
		++	+++
		-	++
Score	0,17±0,4	1,5±1	0,8±0,6

Para confirmar os resultados relativos à deposição de colágeno pela coloração de tricrômica de Masson, foram realizados ensaios qualitativos por imunohistologia para avaliação da expressão de colágeno I (Figura 4.6A, B e C) e fibronectina (Figura 4.6D, E e F) nos tecidos dos mesmos animais. Os resultados obtidos demonstraram uma pequena marcação para colágeno I e fibronectina no coração dos animais não infectados (Figura 4.6A e D). Foi também observada uma menor expressão destas proteínas no coração do grupo de animais infectados tratados (Figura 4.6C e F) em relação ao grupo não tratado (Figura 4.6B e E), visualizado pela marcação em vermelho, corroborando os dados anteriores.

Para analisar de forma quantitativa a intensidade de fibrose cardíaca observada pelas técnicas microscópicas, ensaios de *Western blot* foram realizados para quantificação destas proteínas de matriz extracelular. Esta análise revelou um aumento de 4 vezes na expressão de fibronectina (Figura 4.7A e C, $p<0,05$) e de 5,5 vezes na expressão de colágeno I (Figura 4.7B e D, $p<0,05$) no tecido cardíaco dos camundongos infectados em comparação com os não infectados. Observamos que o **Tratamento I** inibiu o aumento nos níveis de colágeno I e fibronectina induzidos pela infecção, em 60,8% e 43,6%, respectivamente (Figura 4.7, $p<0,05$), mantendo os níveis próximos aos observados no grupo não infectado, no caso da expressão de colágeno I, já que a diferença entre o grupo infectado tratado e não infectado não foi significativa.

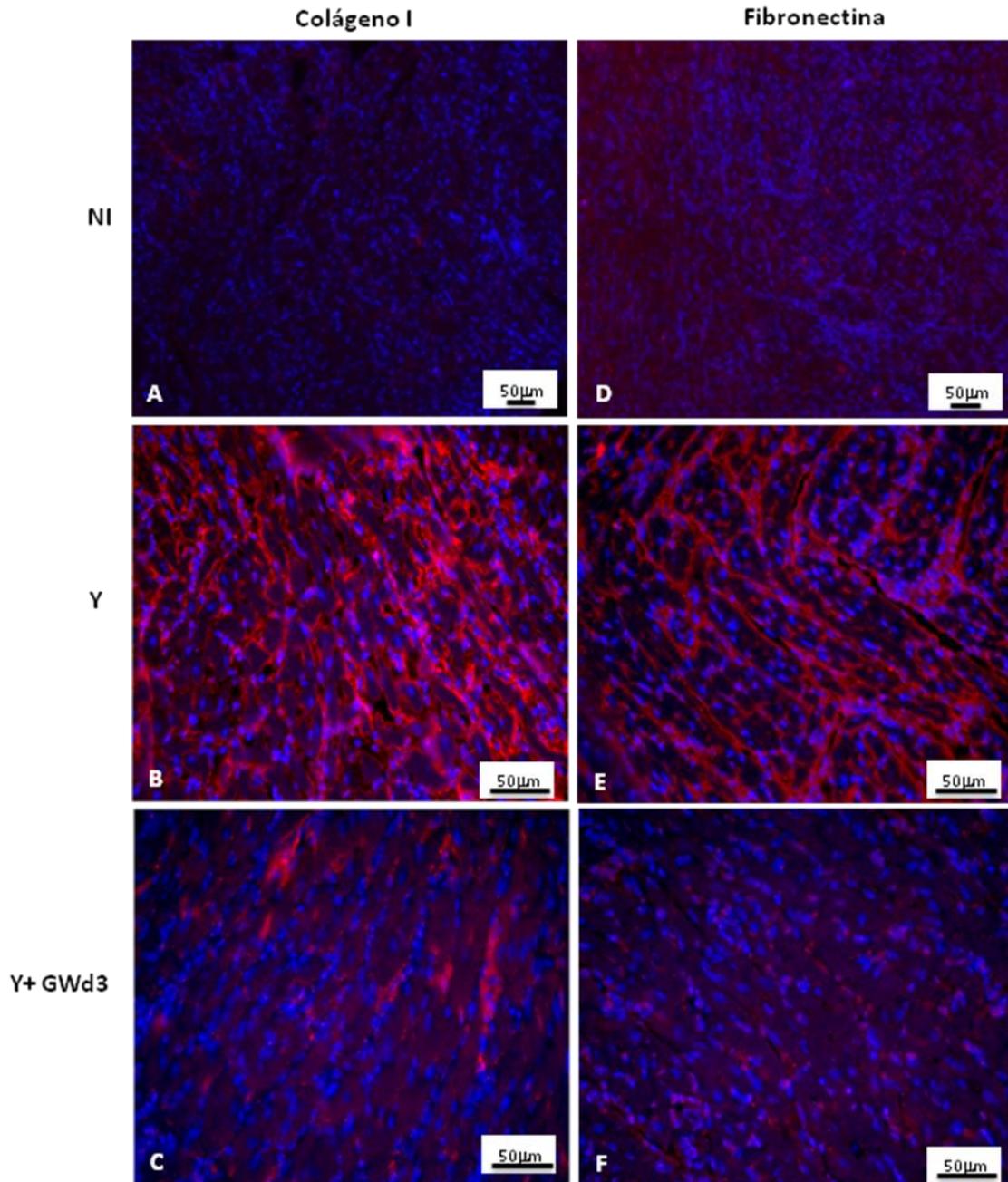


Figura 4.6: Análise no 15^o dpi da expressão de proteínas de matriz extracelular por imunohistologia do coração de animais não infectados (NI), infectados pelo *T. cruzi* (Y) e infectados tratados com GW-788388 (Y+ GWd3): Análise por microscópio de epifluorescência da expressão de colágeno I e fibronectina (em vermelho) nos tecidos cardíacos dos animais (A e D) não infectados, infectados (B e E) não tratados e (C e F) tratados. As amostras foram marcadas por DAPI para visualização do núcleo celular em azul. Barra=50µm. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

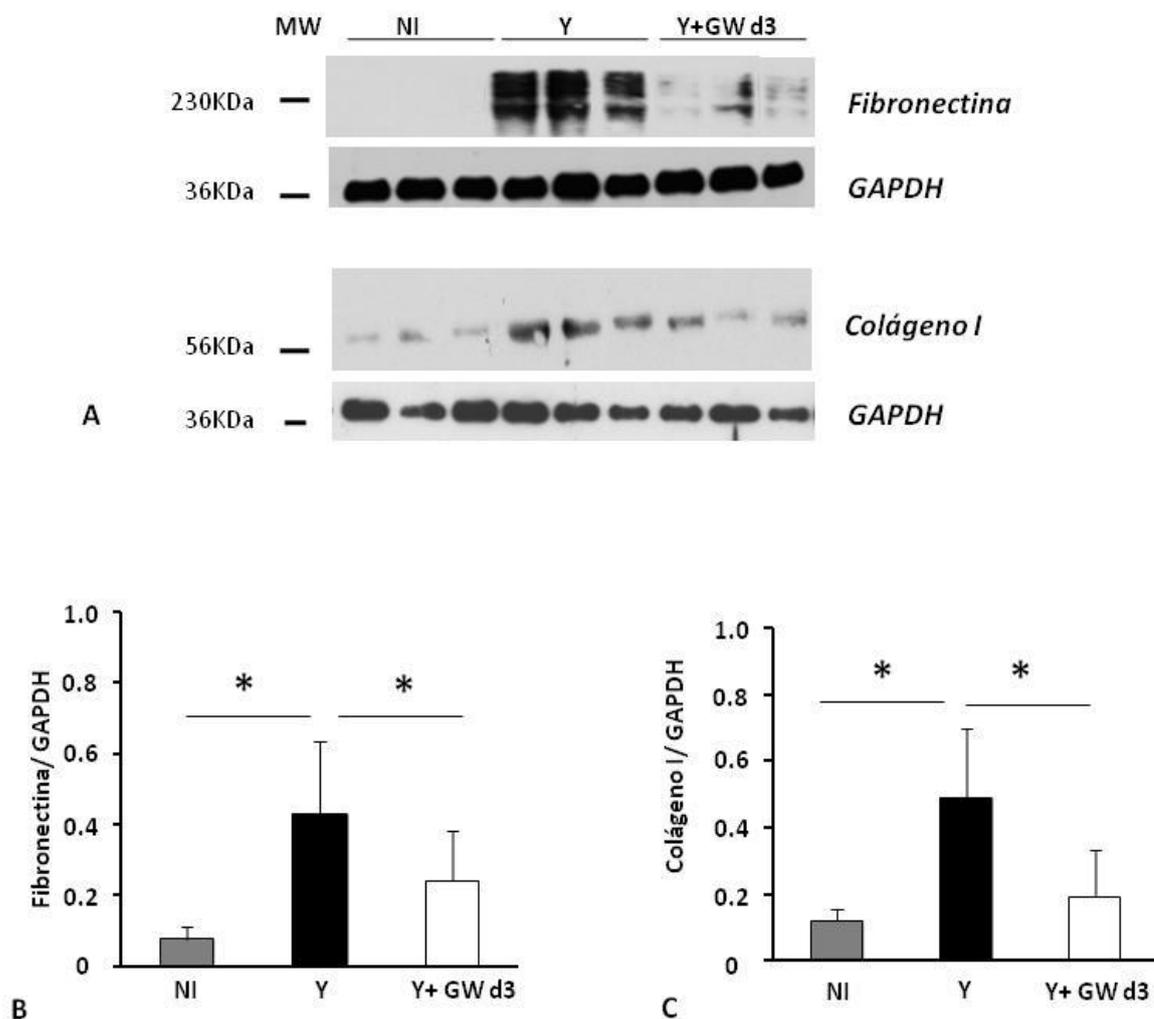


Figura 4.7: Avaliação dos níveis da expressão de elementos de matriz extracelular no 15^o dpi em corações de animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados com GW-788388 no 3^o dpi: (A) Análise por *Western blot* da expressão de fibronectina e colágeno I; gráficos de média \pm desvio padrão das proteínas (B) fibronectina e (C) colágeno I obtidos a partir do tecido cardíaco de camundongos não-infectados (NI), infectados não-tratados (Y) e itratados (Y + GWd3) e analisados através do programa QuantitOne. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

4.2.5 Efeito do composto sobre o dano elétrico cardíaco

A fim de avaliar se além de inibir a evolução da fibrose, o **Tratamento I** protegeria de alterações na condução elétrica cardíaca, os parâmetros de frequência cardíaca e duração dos intervalos PR, QRS e QT foram avaliados através de ECGs dos grupos de animais normais, infectados não tratados e tratados. A análise dos traçados eletrocardiográficos (Tabela 4.3), ilustrada pela Figura 4.8, mostrou que os animais infectados por *T. cruzi* apresentaram diversas alterações elétricas quando comparados aos animais não-infectados. Essas alterações incluem: 1) bradicardia sinusal, representada pela redução significativa da frequência cardíaca de $774,2 \pm 30,6$ para $495,8 \pm 79,2$ bpm ($p < 0,001$); 2) redução na velocidade da condução elétrica atrioventricular, representado pela maior duração do intervalo PR (de $28,6 \pm 3,1$ para $50,4 \pm 8,2$ ms; $p < 0,001$); 3) anormalidade na condução intraventricular, observada pelo aumento na duração do intervalo QRS (de $8,6 \pm 1,4$ para $10,6 \pm 2,7$ ms; $p < 0,05$) e 4) anormalidade na repolarização ventricular observado pelo aumento do intervalo QT (de $22,8 \pm 8,9$ para $29,6 \pm 5,5$ ms; $p < 0,05$).

Ao comparar as alterações elétricas induzidas pela infecção, com os traçados eletrocardiográficos obtidos dos grupos de animais infectados e submetidos ao **Tratamento I**, observamos que o bloqueio da atividade de TGF- β inibiu significativamente o desenvolvimento de algumas das alterações analisadas por ECG. O valor da frequência cardíaca observado no grupo dos animais infectados não tratados, que foi de $495,8 \pm 79,2$ bpm, frente ao tratamento aumentou para $554,3 \pm 44,5$ bpm ($p < 0,05$), indicando uma melhora no achado de bradicardia sinusal. A anormalidade na repolarização ventricular foi outro achado encontrado que exibiu melhora no grupo tratado em relação ao grupo não tratado, sendo o valor do intervalo QT de $25,3 \pm 6,4$ ms e $29,6 \pm 5,5$ ms, respectivamente ($p < 0,05$).

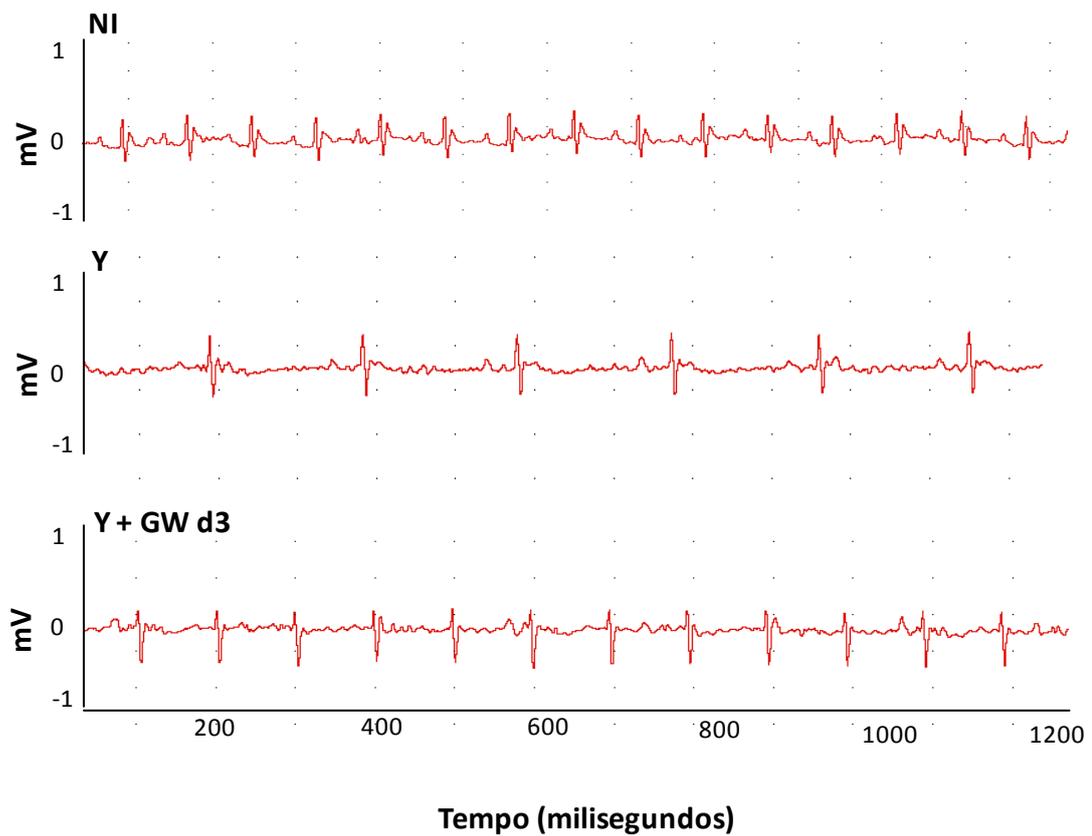


Figura 4.8: Eletrocardiograma no 15º dpi dos animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados com GW-788388 no 3º dpi: Traçados eletrocardiográficos de animais não-infectados (NI), infectados não-tratados (Y) e tratados (Y + GWd3). Os dados representam média \pm desvio padrão de no mínimo de 8 animais por grupo em 2 experimentos independentes (n=23 animais por grupo).

Tabela 4.3: Parâmetros eletrocardiográficos obtidos no 15º dpi dos animais tratados ou não no 3º dpi

Grupo	Frequência cardíaca (bpm)	Intervalo PR (ms)	Intervalo QRS (ms)	Intervalo QT (ms)
NI	774.2±30.6	28.6±3.1	8.6±1.4	22.8±8.9
Y	495.8±63.4 ^a	50.4±8.2 ^a	10.6±1.3 ^b	29.6±4.3 ^b
Y+ GW d3	554.3±44.5 ^{c,d}	45.1±8.4	9.7±2	25.3±6.4 ^c

^a $p < 0.001$ comparação entre grupos NI (não infectado) e infectado;

^b $p < 0.05$ comparação entre grupos NI (não infectado) e infectado;

^c $p < 0.05$ comparação entre grupos infectado e infectado tratado com GW no dia 3;

^d $p < 0.001$ comparação entre grupos NI (não infectado) e infectado tratado com GW no dia 3.

Já foi sugerido na literatura que as injúrias no tecido cardíaco podem estar associadas a uma perda da organização das junções comunicantes do tipo *Gap*, que em alguns casos pode ter direta relação com o dano elétrico resultante. Esse fenômeno envolve o remodelamento da principal proteína integrante das junções do tipo *Gap*, a Cx43 (Campos de Carvalho e cols, 1992). Para verificar sua expressão no tecido cardíaco, foi realizada a análise quantitativa por *Western Blot* e a qualitativa por imunohistologia. Como já descrito na literatura (Campos de Carvalho e cols, 1992; Adesse e cols, 2008; Waghbi e cols, 2009b) a análise por *Western Blot* do coração dos animais estudados, revelou uma redução de 39% na expressão de Cx43 nos camundongos infectados em relação aos camundongos normais (Figura 4.9A e B, $p < 0,001$). O **Tratamento I** foi capaz de reverter a perda da expressão de Cx43, observada no grupo infectado, uma vez que observamos valores 49% mais elevados no grupo tratado em relação ao não tratado (Figura 4.9A e B, $p < 0,05$). A fim de ilustrar esta análise quantitativa, foi verificada a expressão da Cx43 no tecido cardíaco por imunohistologia. Os dados alcançados confirmaram uma menor expressão de Cx43 no coração dos animais infectados não tratados (Figura 4.9D) em relação aos que foram submetidos ao **Tratamento I** (Figura 4.9E), que apresentou padrão similar ao observado no grupo não infectado (Figura 4.9C).

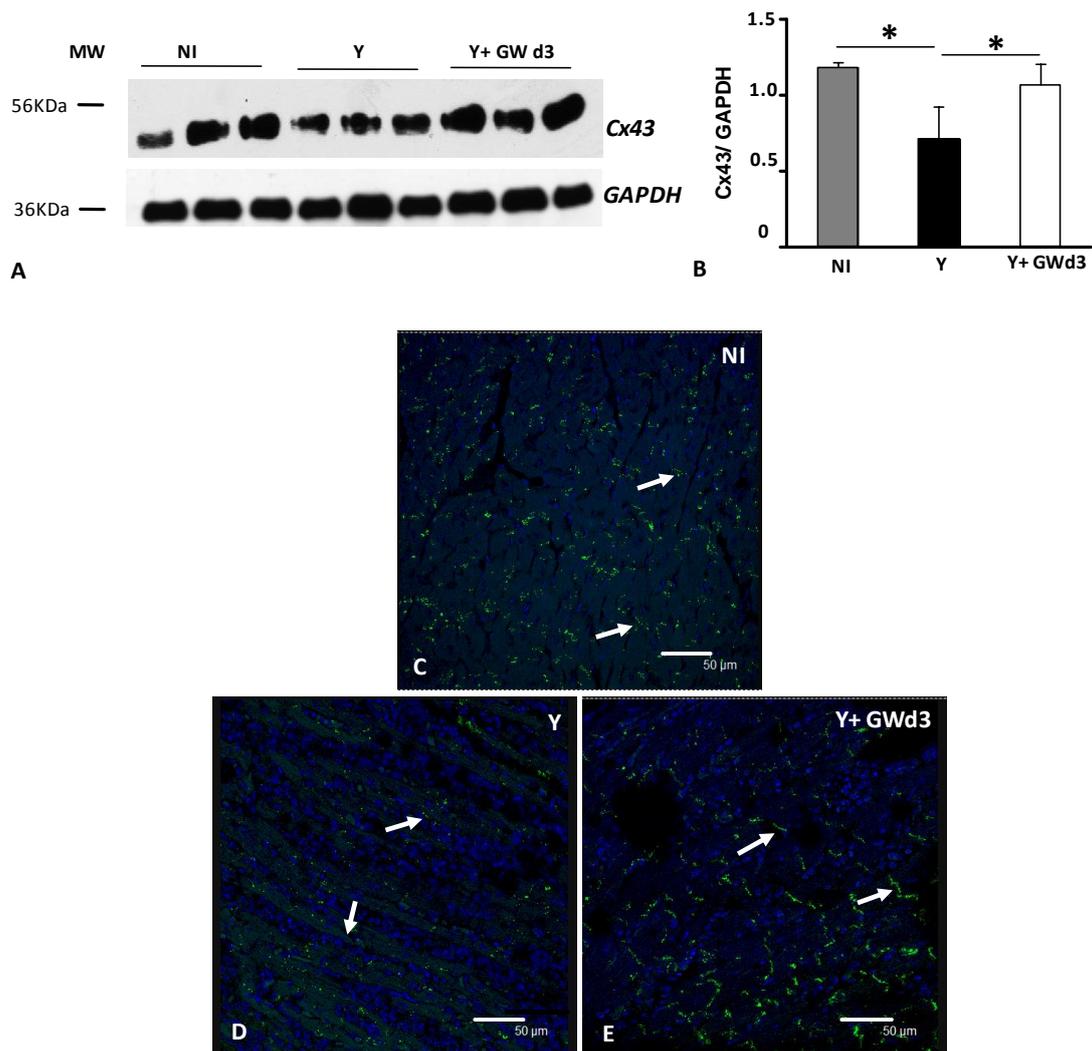


Figura 4.9: Avaliação no 15^o dpi dos níveis de expressão de Cx43 no coração de animais não infectados e infectados pelo *T. cruzi* (10^4), não tratados e tratados com GW-788388 no 3^o dpi: Análises por (A) Western Blot; (B) Gráfico de média \pm desvio padrão dos valores obtidos para a expressão de Cx43 pelo programa QuantitOne e imunohistologia (visualizada pela coloração verde) de tecido cardíaco de camundongos não infectados (C) infectados não-tratados (D) e tratados (E). As amostras foram marcadas com DAPI para visualização do núcleo celular em azul (Aumento 400X). Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$. Barra= 50mm. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

4.2.6 Influência do Tratamento I sobre os níveis circulantes de NO

Foi realizada uma cinética da concentração de NO no plasma dos animais durante a infecção experimental aguda. Avaliando os níveis do produto final de sua oxidação (nitrito), observamos que os valores de NO foram significativamente aumentados nos animais infectados em todos os tempos estudados (8^o, 15^o e 24^o dpi) em relação aos não infectados. No 8^o dpi, houve um aumento de 2 vezes na concentração de nitrito: enquanto no grupo não infectado este valor foi de 21,8± 3,6 μM, no grupo infectado foi de 44± 2,4 μM, atingindo níveis máximos de 96± 0,8 μM no 15^o dpi. Interessantemente no 8^o dpi o **Tratamento I** foi capaz de induzir um aumento ainda mais acentuado na concentração de NO, mesmo em relação ao grupo infectado e não tratado, apresentando uma concentração de 67± 4,8 μM, refletindo um aumento de 52% em relação ao grupo infectado não tratado. Nos outros tempos de estudo (15^o e 24^o dpi) não houve diferenças significativas entre os grupos tratados ou não (Figura 4.10).

4.3 Tratamento II: 13^o dia após a infecção por *T. cruzi*

Para avaliar a capacidade de GW-788388 em reverter os danos, principalmente os cardíacos, ocasionados pela infecção aguda, já estabelecidos no 15^odpi, decidimos administrar o composto 13 dias após a infecção. Nestes estudos, foram analisados o efeito do composto em relação à parasitemia, a sobrevida, ao peso dos animais e aos danos observados nos tecidos cardíaco, hepático e renal induzidos durante a infecção pelo *T. cruzi*.

4.3.1 Acompanhamento dos níveis de parasitemia, sobrevida e peso dos animais

Conforme mostrado na Figura 4.11A, a parasitemia não foi alterada com o **Tratamento II**, uma vez que o pico de parasitemia (8^o dpi) foi anterior a intervenção (13^o dpi). Com relação à sobrevida alcançada, observamos uma redução, não significativa, nos animais infectados tratados em relação aos animais não tratados (Figura 4.11B). A massa corporal também não foi alterada em resposta ao **Tratamento II** em relação ao grupo infectado não tratado (Figura 4.11C), indicando que o tratamento não assumiu um efeito protetor.

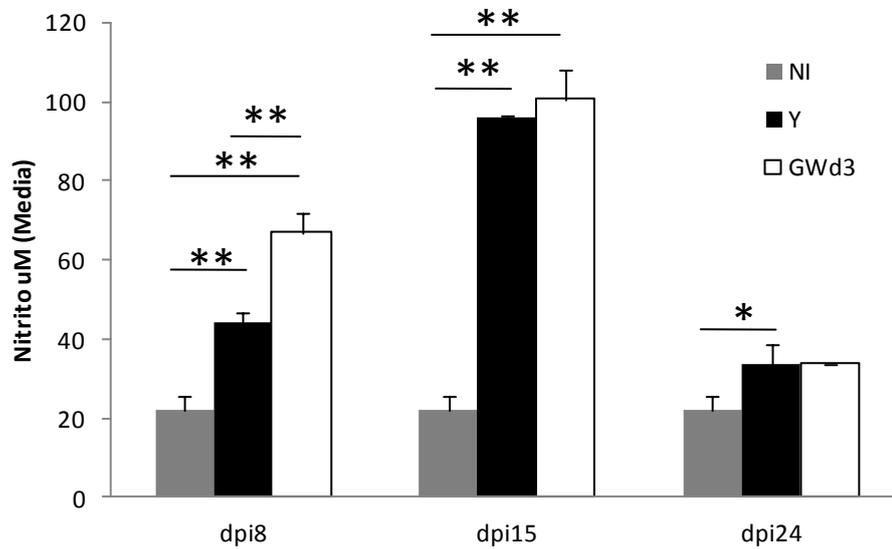


Figura 4.10: Dosagem dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) pelo *kit Nitric Oxide Colorimetric Assay*, nos animais não infectados e infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados no 3º dpi: Gráfico da média \pm desvio padrão representando a concentração de nitrito (μM) durante a cinética da infecção (8º, 15º e 24º dpi) nos animais não infectados (NI, barra cinza), infectados não tratados (Y, barra preta) e tratados (Y + GWd3, barra branca). Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo.

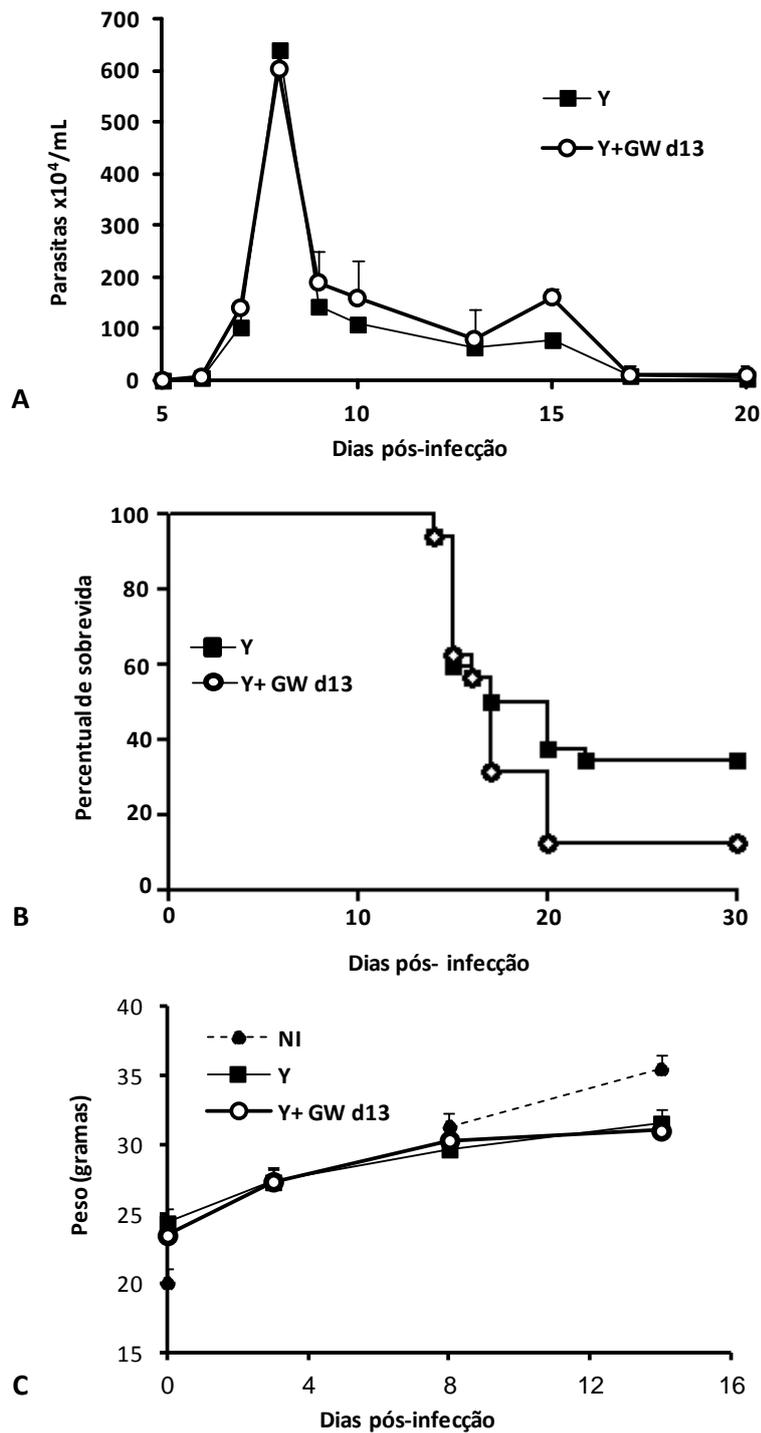


Figura 4.11 Efeito do tratamento com GW-788388, administrado por gavagem, no 13^o dpi: (A) cinética de parasitemia, (B) percentual de sobrevivência e (C) curva ponderal dos animais não infectados (NI), infectados não-tratados (Y) e tratados (Y+GW d13). Os dados representam média \pm desvio padrão de no mínimo 8 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=38 animais por grupo).

4.3.2 Efeito do composto no parasitismo e inflamação no tecido cardíaco

Para investigar se o **Tratamento II** protegeria contra os danos teciduais causados pela infecção, o coração de nove animais por grupo experimental, totalizando três ensaios independentes, foram analisados no 15º dpi. A análise dos cortes histológicos dos animais infectados tratados ou não pelo composto mostrou que ambos os grupos apresentaram intenso parasitismo tissular (Figura 4.12E), observado pelo número de ninhos de amastigotas, que foi de $190,3 \pm 55,3 \times 10^4$ ninhos/30 campos no grupo não tratado (Figura 4.12A, setas vazadas) e de $154,3 \pm 39,7 \times 10^4$ ninhos/30 campos no grupo tratado (Figura 4.12B, setas vazadas).

Além disso, foi observado que esse esquema de tratamento não alterou significativamente o número de infiltrados inflamatórios entre os grupos infectados não tratados, que apresentava valores de $194,6 \pm 51,3 \times 10^4$ / 30 campos, e os tratados que apresentaram $116,3 \pm 56,2 \times 10^4$ infiltrados inflamatórios/30 campos (Figura 4.12C, D e setas cheias). Embora esta redução não tenha sido significativa, representa 40% de queda no número total de infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco dos animais (Figura 4.12F). Esses resultados indicam que o **Tratamento II** não apresentou efeitos protetores contra danos no tecido cardíaco.

4.3.3 Efeito do composto sobre o dano elétrico cardíaco

Para verificar se o **Tratamento II** foi capaz de interferir nas alterações de condução elétricas cardíacas já observadas no 15º dpi, foram realizados ECGs nos diferentes grupos experimentais. Essa análise demonstrou que o **Tratamento II** inibiu parcialmente o desenvolvimento de alterações eletrocardiográficas causadas pela infecção (Tabela 4.4). A bradicardia sinusal observada nos grupos infectados não tratados, com valor de frequência cardíaca de $495,8 \pm 79,2$ bpm, foi parcialmente recuperada no grupo tratado que exibiu o valor de $597,8 \pm 76,7$ bpm ($p < 0,001$). Os resultados relativos à duração do intervalo PR, demonstrou uma redução deste intervalo de $50,4 \pm 8,2$ ms no grupo infectado não tratado para $43,6 \pm 10$ ms no grupo tratado ($p < 0,05$), o que sugere uma melhora de condução atrioventricular. Em relação ao intervalo QT, também observamos que o tratamento levou a uma diminuição deste intervalo em relação ao grupo não tratado, passando de $29,6 \pm 5,5$ ms para $24 \pm 4,4$ ms ($p < 0,001$) no grupo tratado,

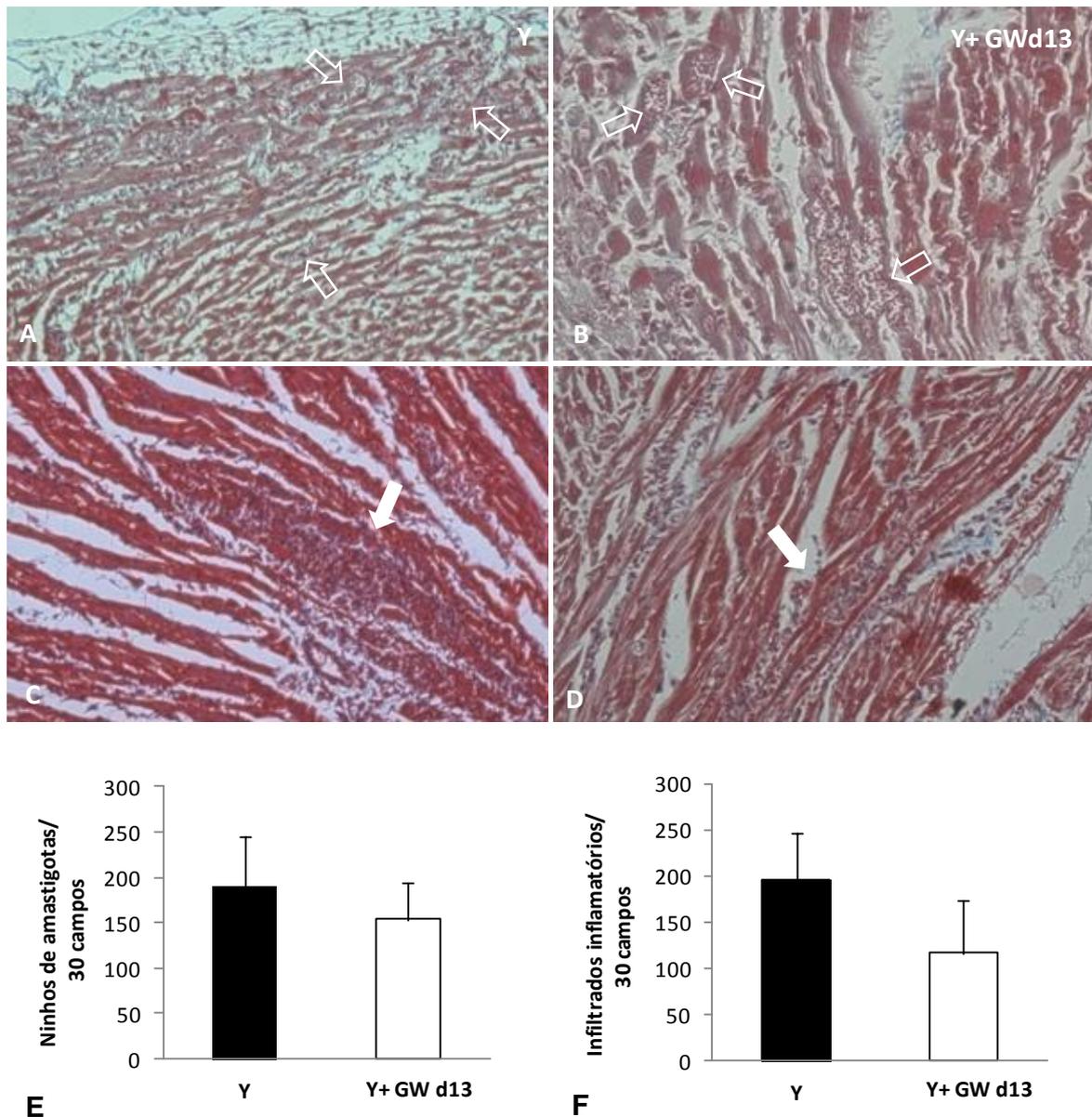


Figura 4.12: Achados histopatológicos no 15^o dpi do coração de animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados com GW-788388 no 13^o dpi: (A) ninhos de amastigota nos tecidos cardíacos dos animais não tratados e (B) tratados (Aumento 400X, setas vazadas); (C) infiltrados inflamatórios nos corações dos animais não tratados e (D) tratados (Aumento 200X, setas cheias); gráficos do número médio (E) de ninhos de amastigota em 30 campos e (F) de infiltrados inflamatórios em 30 campos dos animais não tratados (Y, barra preta) e tratados (Y+ GW d13, barra branca). Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

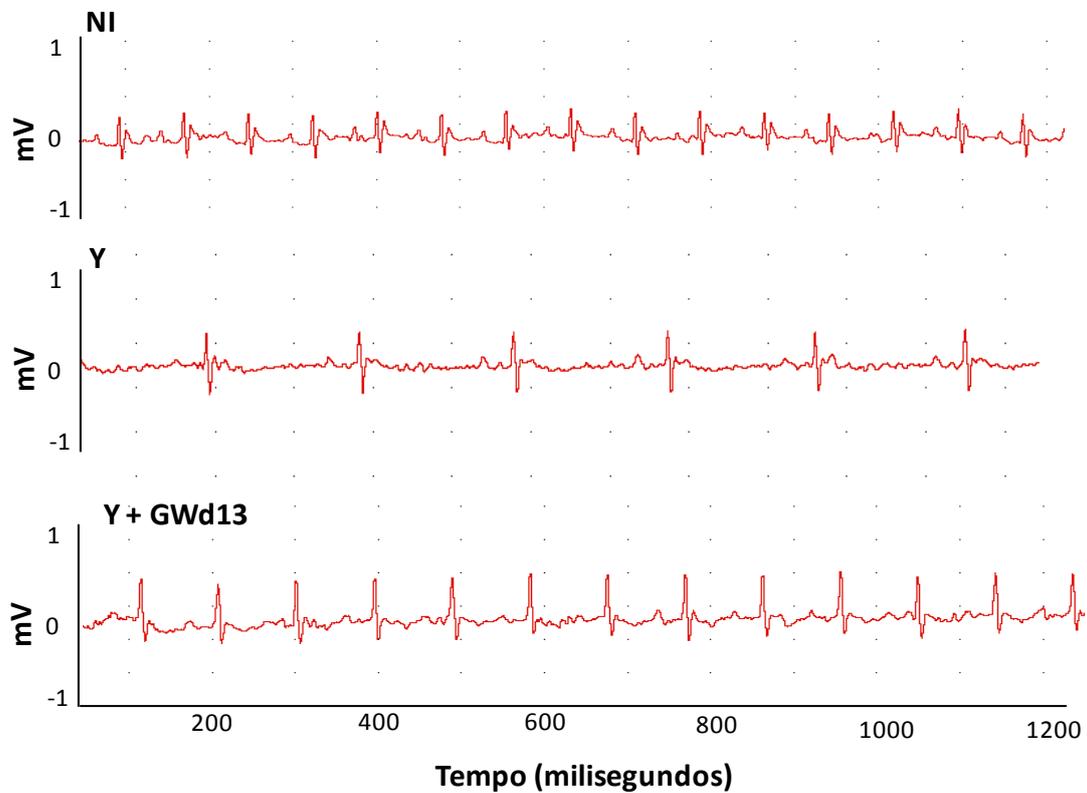


Figura 4.13: Eletrocardiograma no 15º dpi dos animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados com GW-788388 no 13º dpi: Traçados eletrocardiográficos de animais não-infectados (NI), infectados não-tratados (Y) e tratados (Y + GWd13). Os dados representam média \pm desvio padrão do mínimo de 8 animais por grupo em 2 experimentos independentes (n=23 animais por grupo).

demonstrando uma recuperação no parâmetro de repolarização ventricular (Figura 4.13).

Tabela 4.4: Parâmetros eletrocardiográficos no 15º dpi dos animais tratados ou não no 13º dpi

Grupo	Frequência cardíaca (bpm)	Intervalo PR (ms)	Intervalo QRS (ms)	Intervalo QT (ms)
NI	774.2±30.6	28.6±3.1	8.6±1.4	22.8±8.9
Y	495.8±63.4 ^a	50.4±8.2 ^a	10.6±1.3 ^b	29.6±4.3 ^b
Y+ GW d13	597.8±76.7 ^c	43.6±10 ^d	9.8±1.3	24±4.4 ^c

^a $p < 0.001$ comparação entre grupos NI (não infectado) e infectado;

^b $p < 0.05$ comparação entre grupos NI (não infectado) e infectado;

^c $p < 0.001$ comparação entre grupos infectado e infectado tratado com GW no dia 13;

^d $p < 0.05$ comparação entre grupos infectado e infectado tratado com GW no dia 13.

4.3.4 Ação do composto em órgãos secundários

Na tentativa de compreender a ausência de efeito protetor sobre o índice de mortalidade do grupo submetido ao **Tratamento II**, haja vista que não houve diferenças significativas nos níveis de parasitemia, carga parasitária e inflamação cardíacas, com parcial melhora na condução elétrica, buscamos avaliar possíveis efeitos tóxicos em órgãos secundários (fígado e rim). Foi possível observar pela análise do tecido hepático no 15º dpi, através da técnica de Tricrômica de Masson (Figura 4.14A e B), um aumento de 27% no número de infiltrados inflamatórios, variando de $56,7 \pm 3,5 \times 10^4$ /30 campos no grupo infectado não tratado para $77,3 \pm 4,7 \times 10^4$ /30 campos no grupo tratado (Figura 4.14C). Além disso, avaliamos marcadores de dano hepático, tais como alaninamino transferase e aspartatoamino transferase e observamos uma tendência de aumento de 63% nos níveis circulantes de ALT ($p=0,06$) dos grupos infectados tratados em relação aos não tratados, com valores de $213,2 \pm 164,6$ mg/dL e $109,3 \pm 66,9$ mg/dL, respectivamente, (Figura 4.14E). Observamos ainda um aumento de 89% nos níveis de AST ($p < 0,05$), com valores de $432 \pm 89,1$ mg/dL para o grupo não tratado e de $816,5 \pm 323,1$ mg/dL para o grupo tratado (Figura 4.14D), confirmando o dano hepático após o tratamento no 13º dpi. É importante ressaltar que comparando os grupos infectado tratado com o não infectado, as diferenças dos níveis de ALT ($213,2 \pm$

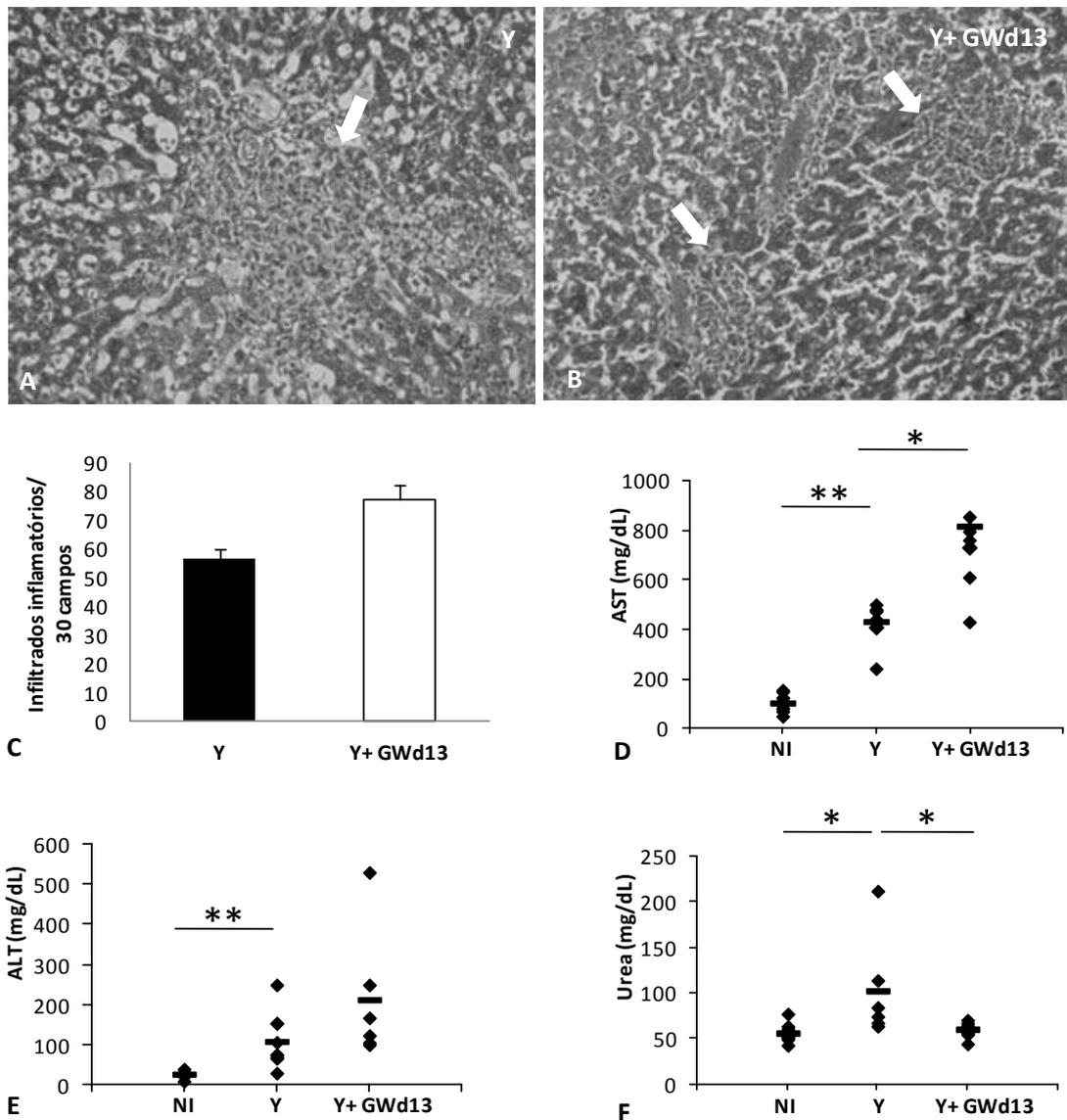


Figura 4.14: Achados histopatológicos no 15º dpi do fígado e a dosagem de marcadores hepáticos e renal de animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e submetidos ou não ao tratamento com GW-788388 no 13º dpi: (A) infiltrados inflamatórios no fígado dos animais não tratados e (B) tratados (Aumento 200X, setas cheias); (C) gráfico do número médio de infiltrados inflamatórios em 30 campos dos animais não tratados (barra preta) e tratados (barra branca); os dados representam média \pm desvio padrão de no mínimo de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n= 9 animais por grupo). Gráficos representando valores individuais dos níveis plasmáticos das transaminases hepáticas (D) aspartatoamino transferase (AST) e (E) alaninamino transferase (ALT); e marcador de função renal (F) ureia em animais não infectados (NI), infectados não tratados (Y) e tratados (Y+ GW d13); os dados representam média \pm desvio padrão do mínimo de 8 animais por grupo. Asterisco indica diferença significativa entre os grupos, * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,001$.

164,6 e $27,8 \pm 7,9$ mg/dL, respectivamente) e AST ($816,5 \pm 323,1$ e $103,5 \pm 34,2$ mg/dL, respectivamente) alcançaram diferenças de cerca de oito vezes.

Além do fígado, avaliamos a função renal dos animais estudados através da concentração de ureia circulante. Como descrito no tópico 4.2.3, a infecção pelo *T. cruzi* induziu um aumento de 84% nos níveis de ureia no 15º dpi, indicando um intenso dano renal. Contudo, o bloqueio da atividade de TGF- β no 13º dpi foi capaz de restaurar esta perda de função induzida pela infecção. Enquanto o valor do grupo infectado não tratado foi de $101,6 \pm 56,5$ mg/dL, no grupo submetido ao **Tratamento II** este valor foi de $59,5 \pm 7,7$ mg/dL, resultando em uma redução significativa de 32% nos níveis de ureia ($p < 0,05$) e retornando a níveis próximos ao grupo não infectado (Figura 4.14F).

4.4 Tratamento III: 20º dia após a infecção por *T. cruzi*

Com o objetivo de analisar se a inibição da via de sinalização de TGF- β seria capaz de reverter um processo fibrótico cardíaco já instalado, como observado no 15º dpi, a administração do composto foi realizada no 20º dpi. Neste período de infecção aguda observamos ausência de ninhos de amastigotas, redução de infiltrados inflamatórios, e uma importante deposição de colágeno (score da análise semi quantitativa = $2,3 \pm 0,6$) evidenciando a presença de fibrose cardíaca (Figura 4.15, Tabela 4.5).

4.4.1 Ação do composto sobre a sobrevivência dos animais

O tratamento no 20º dpi, conforme mostrado na Figura 4.16A e B, manteve a sobrevivência dos animais de forma significativa ($p < 0,05$). Enquanto 30% dos camundongos infectados não tratados morreram após o 21º dpi, os animais submetidos ao **Tratamento III** tiveram essa mortalidade interrompida após este período. Para melhor visualizar este dado, a curva de sobrevivência foi ampliada a partir do ponto da infecção em que os animais receberam o tratamento (Figura 4.16B).

4.4.2 Efeito sobre a deposição de colágeno no tecido cardíaco

Para analisar o processo fibrótico cardíaco instalado, os corações dos animais infectados tratados ou não foram obtidos no 24º dpi e processados para coloração por Tricrômica de Masson e para *Western Blot*. Os cortes

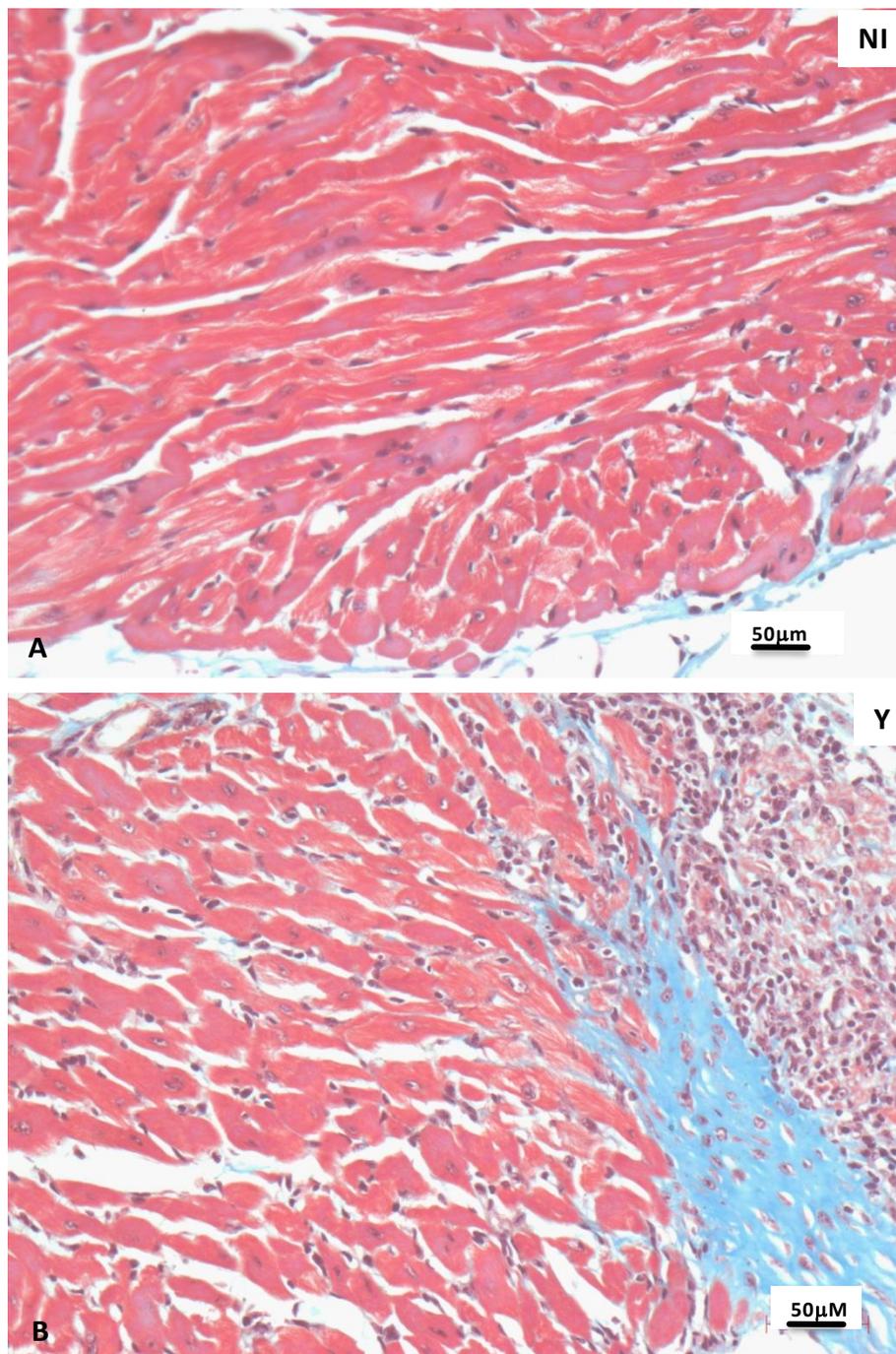


Figura 4.15: Amostras teciduais de coração de animais (A) não infectados e (B) infectados pelo *T. cruzi* (10^4) no 20º dpi coradas pela técnica de Tricrômica de Masson para marcação de colágeno, visualizado em azul claro (Aumento 200X). Barra= 50mm.

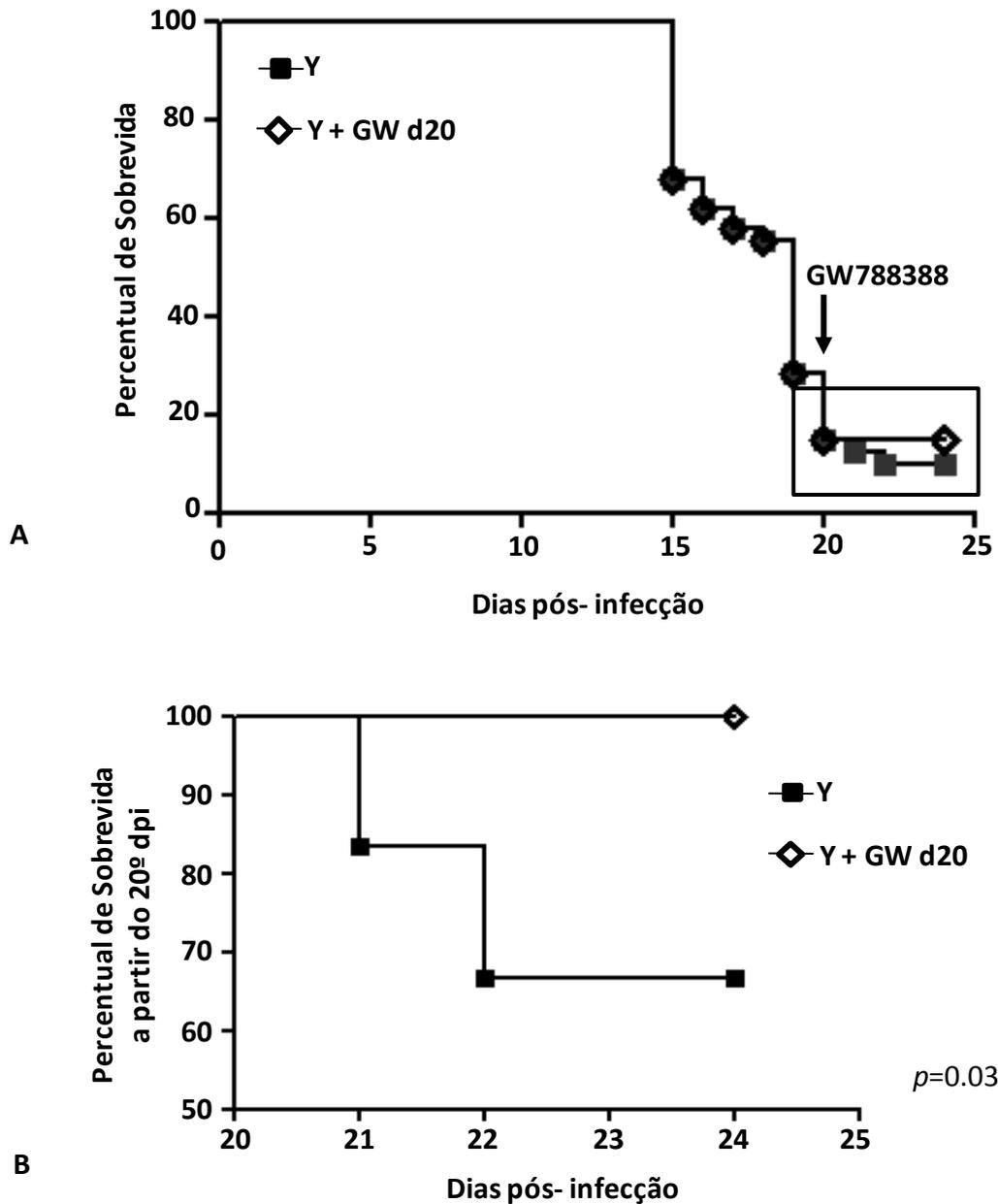


Figura 4.16: Efeito do tratamento com GW-788388 administrado no 20º dpi em camundongos infectados pelo *T. cruzi* (10^4): (A) percentual de sobrevida dos animais infectados não tratados (Y) e tratados (Y+GW d20). (B) ampliação da área marcada em (A) mostrando a curva de sobrevida a partir do dia de tratamento (20º dpi) para melhor visualizar a interrupção significativa da mortalidade no grupo de animais tratados ($p=0,03$). Os dados representam média \pm desvio padrão de 4 animais por grupo em 3 experimentos independentes ($n=12$ animais por grupo).

histológicos dos animais de cada grupo experimental foram analisados individualmente e observamos através de análise semi-quantitativa que os animais infectados apresentaram um aumento de 13 vezes na deposição de colágeno em comparação com o grupo não-infectado (Figura 4.17A, B e D). Os animais submetidos ao **Tratamento III** apresentaram uma diminuição na deposição de colágeno induzida durante a infecção, reduzindo em seis vezes o seu valor (de $2,25 \pm 0,9$ para $0,33 \pm 0,8$; Figura 4.17B, C e D). No grupo infectado observamos uma grande heterogeneidade na extensão de área marcada, variando de uma a três cruzes, enquanto o grupo tratado apresentou uma maior homogeneidade: dos seis animais analisados, apenas um alcançou duas cruzes (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Classificação individual do grau de deposição de colágeno de acordo com a extensão de área marcada no tecido cardíaco no 20^o e 24^o dpi

	NI	Y dpi 20	Y dpi 24	Y+ GW d20 dpi 24
Extensão de área marcada	-	++	++	-
	-	+++	+++	-
	-	++	+	++
	-		+++	-
	+			-
				-
Score	0,17±0,4	2,3±0,6	2,25±0,9	0,33±0,8

Para confirmar quantitativamente estes achados, foi realizada a análise da expressão de colágeno I por *Western blot* nos tecidos obtidos e processados no 24^o dpi (Figura 4.18A e B). Observamos que a infecção aumentou significativamente ($p < 0,001$) a expressão de colágeno I: $0,14 \pm 0,02$ no grupo não infectado para $1,88 \pm 0,3$ no grupo infectado (Figura 4.18C). A análise quantitativa revelou um aumento de 13 vezes na deposição do colágeno nos animais infectados em relação aos não infectados, confirmando as análise histológica. O esquema de **Tratamento III** foi capaz de diminuir significativamente em 47% a expressão de colágeno I, sendo estes valores reduzidos de $1,88 \pm 0,3$ no grupo infectado para $0,98 \pm 0,3$ no grupo infectado

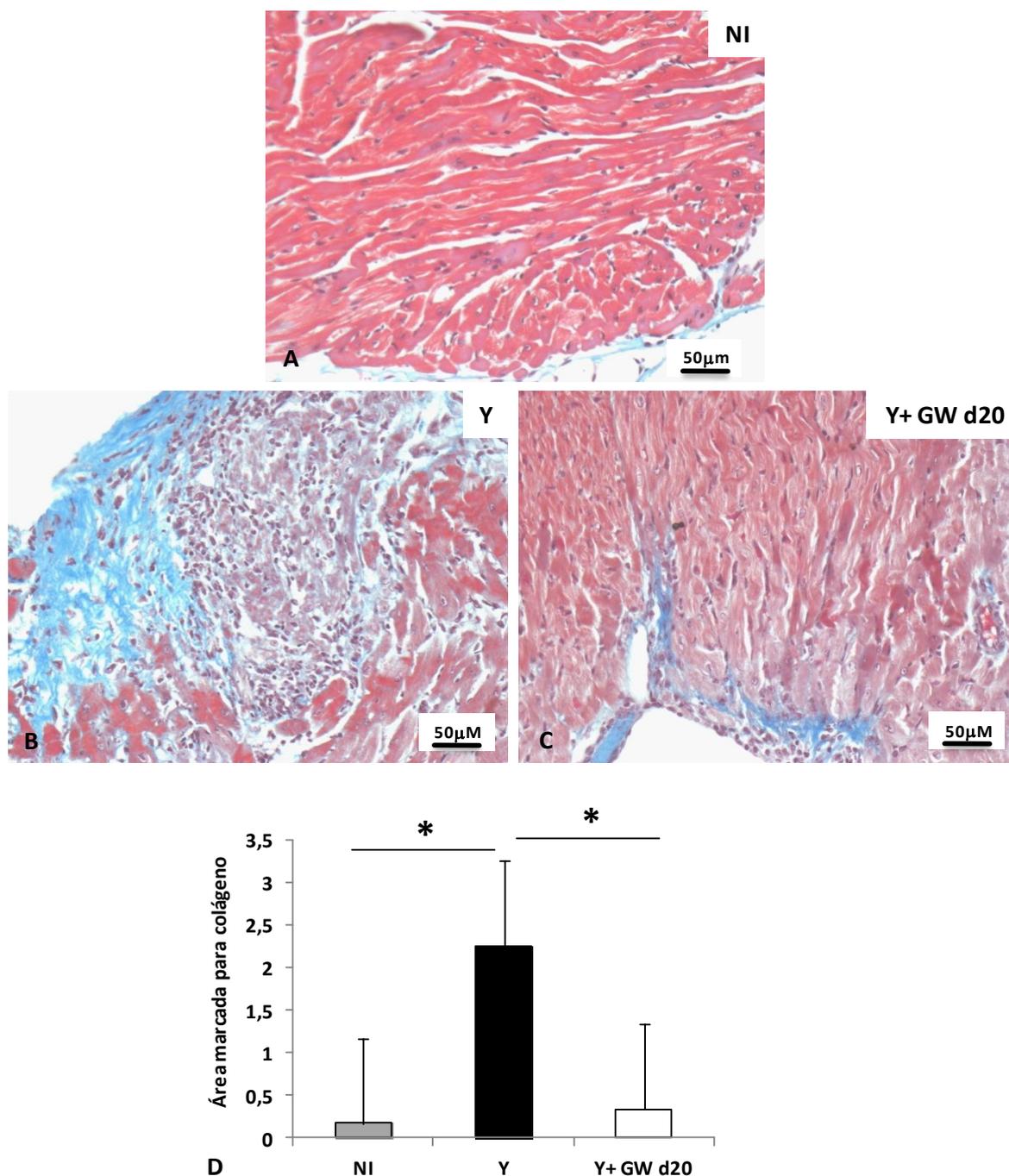


Figura 4.17: Amostras teciduais coradas por tricrômica de Masson para marcação de colágeno, visualizado em azul claro (Aumento 200X). Foram obtidos corações de animais: (A) não infectados (NI), infectados pelo *T. cruzi* no 24^o dpi (B) não tratados (Y) e (C) tratados com GW-788388 no 20^o dpi (Y+ GW d20); (D) Gráfico da média \pm desvio padrão, representando o grau de deposição de colágeno de acordo com a extensão da área marcada nos animais não infectados (barra cinza), infectados não tratados (barra preta) e tratados (barra branca). Asterisco indica diferença significativa entre os grupos, * $p < 0,05$. Barra= 50mm. Os dados representam média \pm desvio padrão do mínimo de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

tratado ($p < 0,05$), demonstrando mais uma vez uma atividade de reversão de fibrose frente ao tratamento com GW-788388 (Figura 4.18C).

4.4.3 Influência do Tratamento III sobre os níveis circulantes de NO

A análise da concentração sanguínea do NO nos animais submetidos ao **Tratamento III**, foi avaliada no 24° dpi. Neste estudo, o grupo infectado apresentou valores de $31,2 \pm 5,2 \mu\text{M}$ enquanto o grupo não infectado revelou valores de $21,8 \pm 3,7 \mu\text{M}$. Estes dados apontam para um aumento de 43% nos níveis desta molécula frente à infecção. No curso do **Tratamento III** foi observado que a inibição da atividade de TGF- β , mesmo que tardiamente, elevou ainda mais os níveis de concentração de NO, alcançando valores de $68,6 \pm 17,1 \mu\text{M}$ (Figura 4.19, $p < 0,05$).

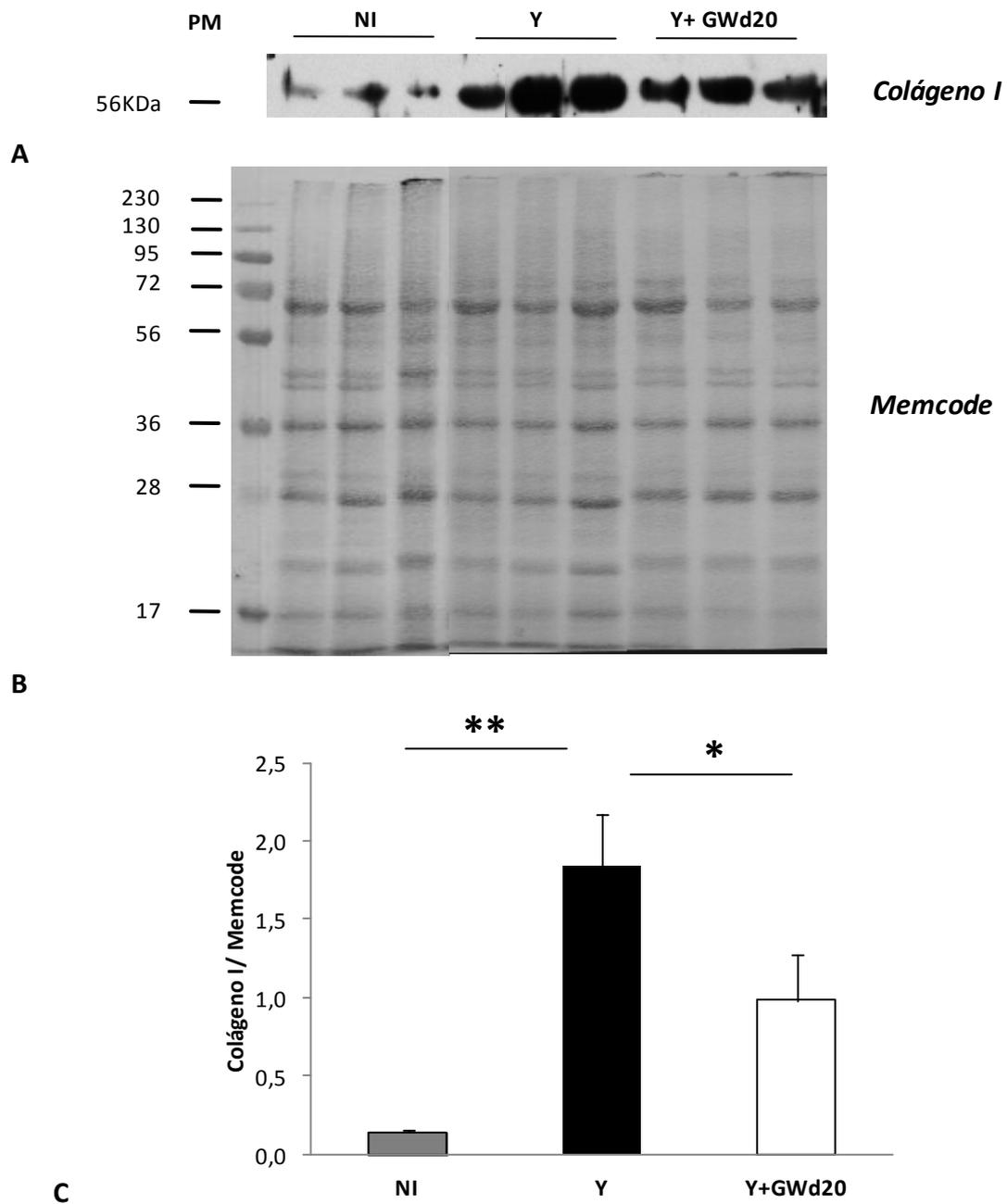


Figura 4.18: Avaliação no 24^o dpi da expressão de colágeno I no coração de animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) e tratados com GW-788388 no 20^o dpi: (A) análise *Western Blot*, (B) Membrana de nitrocelulose corada pelo Memcode e (C) gráfico de média \pm desvio padrão dos valores de colágeno I obtidos através do programa QuantitOne. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$. Os dados representam média \pm desvio padrão do mínimo de 3 animais por grupo em 3 experimentos independentes (n=9 animais por grupo).

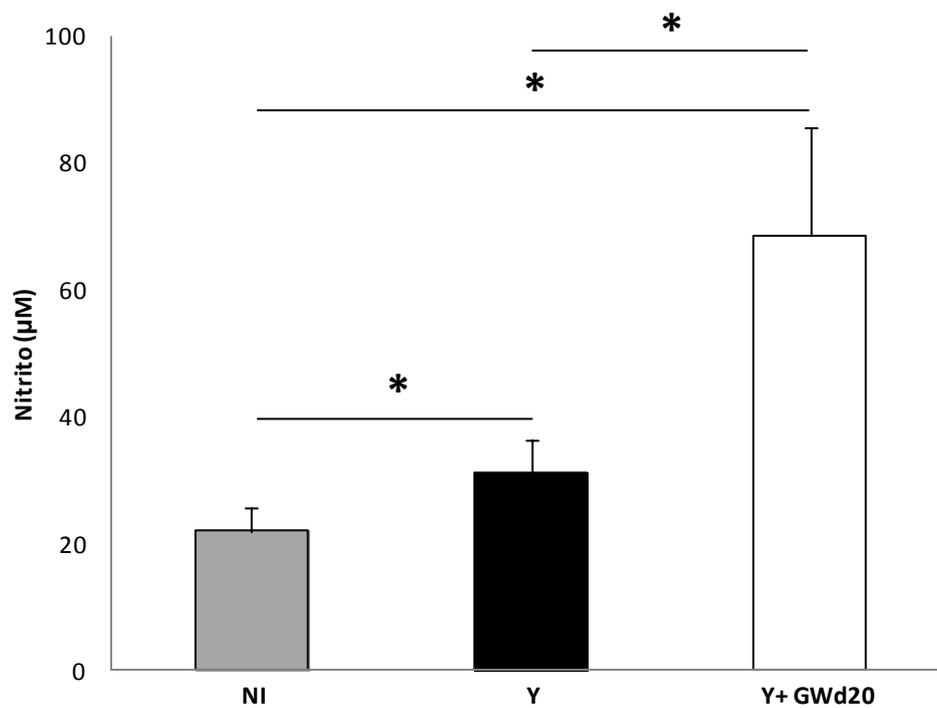


Figura 4.19: Dosagem no 24^o dpi dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) pelo *kit Nitric Oxide Colorimetric Assay* nos animais infectados pelo *T. cruzi* (10^4) tratados com GW-788388 no 20^o dpi: gráfico da média \pm desvio padrão, representando a concentração de nitrito (μM) nos animais não infectados (barra cinza), infetados não tratados (barra preta) e tratados (barra branca). Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, * $p < 0,05$. Os dados representam média \pm desvio padrão de 3 animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

A fibrose é uma das manifestações mais significativas da CCC, estando associada à presença de infiltrados inflamatórios e degeneração das células cardíacas (Andrade e cols, 1989; Rossi e Bestetti, 1995; Rossi, 2001). A matriz extracelular exerce um papel fundamental na estrutura e função do miocárdio, e assim o acúmulo progressivo de colágeno intersticial, e de outros componentes de matriz, tem sido relacionado à perda do desempenho contrátil e do desenvolvimento de arritmias na doença de Chagas (Rossi, 1998).

De fato, os mecanismos que regem a progressão da fibrose em diferentes órgãos e tecidos são semelhantes e possuem características comuns. O acúmulo progressivo de tecido conjuntivo e deposição excessiva de matriz extracelular resulta na substituição da arquitetura normal do tecido e perda de sua atividade funcional. Este processo é mediado por citocinas e fatores de crescimento solúveis, que regulam a migração, proliferação e diferenciação celular, assim como a síntese e degradação de componentes de matriz extracelular, dentre os quais se destaca o TGF- β (revisto por Gharaee-Kermani e Phan, 2001).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o SB-431542, um composto que inibe a sinalização de TGF- β reduz a infecção e previne o dano cardíaco *in vitro* e *in vivo* (Waghabi e cols, 2007, 2009b), sugerindo que esta nova classe de agentes terapêuticos poderia ser potencialmente utilizada em associação com compostos tripanocidas no tratamento de pacientes com cardiopatia chagásica. No presente estudo, demonstramos que um composto representante de uma classe mais potente de inibidores do receptor de TGF- β tipo I e II, GW-788388 (GlaxoSmithKline Pharmaceuticals), foi capaz de proteger, parcialmente, camundongos de danos cardíacos e hepáticos causados pela infecção aguda por *T. cruzi*, inibindo o desenvolvimento de fibrose, quando administrado via oral no 3º dpi. Já foi demonstrado que GW-788388 inibe eficientemente respostas celulares mediadas por TGF- β por bloquear a atividade cinase dos receptores tipo I e II (Petersen, 2008).

O efeito de GW-788388 foi alcançado com o esquema de tratamento em dose única, em baixas doses (3mg/kg) e principalmente sendo administrado por via

oral. Este composto foi identificado como um relevante inibidor de T β RI e II oralmente ativo, apresentando superior perfil farmacocinético (meia vida de eliminação de 1,3 horas e baixo “clearance” plasmático - 20 ml/min/kg em ratos) em comparação com SB-431542 (Callahan e cols, 2002; Gellibert e cols, 2006). Estudos têm sugerido que TGF- β pode ser um fator chave na geração de fibrose tecidual, estando correlacionado com o desenvolvimento de manifestações sintomáticas da fase crônica cardíaca, observadas na doença de Chagas (Araujo-Jorge e cols, 2008). Desta forma, o bloqueio da sinalização de TGF- β poderia ser uma promissora abordagem terapêutica para o tratamento da doença de Chagas crônica.

No presente trabalho, demonstramos que a administração de GW-788388 em camundongos infectados na fase aguda (**Tratamento I**), atenuou a expressão de alguns componentes chaves que estão envolvidos no desenvolvimento da fibrose cardíaca, prevenindo significativamente os danos cardíacos e hepáticos. Estes achados são consistentes com estudos prévios que mostram que GW-788388 reduz marcadores de fibrose no rim com nefropatia quimicamente induzida (Peng e cols, 2005 e Petersen e cols, 2008). Neste esquema de tratamento, a administração via oral do composto levou a uma sobrevida de cerca de 70% dos animais, enquanto o grupo não tratado alcançou somente 40%. Este dado foi, provavelmente devido à redução da infecção das células hospedeiras, interrompendo o segundo ciclo de infecção, possivelmente decorrente de uma modulação no balanço de secreção de citocinas inflamatórias no início da fase aguda. O tratamento com GW-788388 no 3^o dpi, reduziu tanto o parasitismo circulante quanto o cardíaco. Este dado está de acordo com estudos *in vitro* que demonstraram que a inibição da via de sinalização de TGF- β reduz a invasão dos cardiomiócitos pelo *T. cruzi*, inibe a diferenciação intracelular e induz a apoptose dos parasitos, diminuindo assim, a liberação de tripomastigotas (Waghabi e cols, 2007).

A infecção pelo *T. cruzi* na fase aguda é seguida por uma intensa inflamação composta por células linfo-mononucleares em tecidos alvo, como coração e fígado, levando a um exacerbado dano tecidual e distúrbio de condução elétrica cardíaca. Neste sentido, nossos dados demonstraram que o **Tratamento I** gerou menor inflamação em ambos os tecidos estudados, incluindo redução no tamanho dos

infiltrados inflamatórios, que foi cerca de seis vezes menor que o observado nos animais infectados e não tratados. O efeito benéfico do bloqueio de TGF- β no início da infecção sustenta a ideia de que fatores induzidos pelo parasito e/ou hospedeiro, podem contribuir para o desenvolvimento da patologia observada nesta infecção. Isso indica que o decréscimo no número de parasitos, gerado pelo bloqueio da via de TGF- β , pode estar relacionado a uma menor resposta inflamatória, que por sua vez, reduziu o dano tissular decorrente da inflamação e do parasitismo tissular.

É importante ressaltar que a cepa Y, utilizada no modelo experimental deste estudo, é altamente infecciosa, desencadeando lesões tissulares graves e induz alta mortalidade (Scorza e Scorza, 1972). Assim, a infecção de camundongos suíços por esta cepa resulta em vigorosa inflamação, além de sérias alterações fisiológicas, incluindo: disfunção renal e hepática, podendo gerar choque sistêmico e morte (Paiva e cols 2003). Outro importante achado no presente estudo foi a demonstração do efeito protetor do **Tratamento I** nestes órgãos secundários, indicado pelos níveis de ureia e transaminases hepáticas próximos ao do grupo controle não infectado. Recentemente foi mostrado, que o acometimento renal é um fator envolvido no aumento da mortalidade na infecção experimental aguda pelo *T. cruzi* (Oliveira e cols 2009). Dados também demonstram que o fígado é um dos órgãos mais afetados pela inflamação durante a infecção aguda (Carrera-Silva e cols, 2008). Como também observado no presente trabalho, Carrera-Silva e cols (2008) e Batista e cols (2010) relataram um aumento da atividade das transaminases hepáticas, ALT e AST nos animais infectados por *T. cruzi*, demonstrando o prejuízo das funções hepáticas.

A fibrose é decorrente da inflamação, quando células presentes no tecido conjuntivo como fibroblastos sintetizam proteínas de matriz extracelular para substituir o tecido lesado e TGF- β apresenta papel chave neste fenômeno. Sabe-se que TGF- β modula positivamente a expressão de genes envolvidos na deposição de matriz extracelular (Letterio e Roberts, 1997; revisto por Verrecchia e Mauviel, 2007). Além disso, também foi descrito que a infecção pelo *T. cruzi* induz a secreção de altos níveis de TGF- β em cardiomiócitos cultivados *in vitro* pela ativação da via de Smad- 2 (Waghbi e cols, 2009b). Estes achados nos estimularam a investigar se o tratamento com GW-788388 poderia prevenir o

aumento da regulação de colágeno I e fibronectina cardíacas durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

Nossos resultados revelaram que animais infectados não tratados apresentam acentuado aumento na expressão destas proteínas no tecido cardíaco, indicando presença de fibrose nesta fase da infecção. A análise histológica do tecido cardíaco demonstrou áreas focais de deposição de colágeno no pericárdio e endocárdio, principalmente na região atrioventricular, visualizadas pela marcação por tricrômica de Masson. A fibrose no pericárdio foi frequentemente associada ao grande número de infiltrados inflamatórios no 15º dpi. Na região do endocárdio dos animais infectados, esta observação foi mais evidente ao redor de vasos que apresentavam morfologia alterada devido à vasodilatação. Semelhante ao observado por Bunch e cols (2006) em um modelo canino de insuficiência cardíaca, no nosso estudo, a depleção da atividade de TGF- β regulou negativamente o aumento da expressão das proteínas colágeno I e fibronectina induzida pela infecção. Nossos resultados reforçam a importância desta citocina na evolução da infecção pelo *T. cruzi*.

Além da fibrose, alterações no sistema de condução dos impulsos elétricos representam outra manifestação importante da cardiomiopatia chagásica. Como observado por Bustamante e cols (2003), os dados eletrocardiográficos do presente estudo revelaram alterações elétricas (bradicardia sinusal e aumento dos intervalos PR, QRS e QT) no curso da infecção experimental aguda. Os animais infectados apresentaram uma redução na velocidade de transmissão dos impulsos elétricos, indicada pelo aumento do intervalo PR, sugerindo a presença de bloqueio atrioventricular possivelmente pelo aumento de tecido fibroso observado pela técnica de Masson. Outro importante parâmetro que se mostrou alterado foi o intervalo QT, que é um indicativo de desenvolvimento de arritmia maligna, que pode levar a morte súbita. Utilizando o mesmo modelo experimental adotado neste estudo, da Silva e cols, 2008, Batista e cols, 2010 e de Souza e cols, 2007 também observaram a presença de bradicardia sinusal.

O bloqueio da atividade de TGF- β foi capaz de reduzir algumas destas alterações eletrocardiográficas causadas pela infecção, repercutindo numa melhora na condução elétrica e reduzindo o risco de morte súbita, indicado pela redução significativa da duração do intervalo QT. É possível que essa melhora cardíaca

esteja influenciando, pelo menos em parte, a maior sobrevivência dos animais tratados. Soares e cols (2001) propuseram mecanismos que pudessem elucidar as alterações elétricas e apontaram o sistema imunológico como o agente causador das lesões do miocárdio, gerando distúrbios de condução elétrica, como observado na patologia da doença de Chagas.

Já foi demonstrado que TGF- β é um regulador da expressão da proteína Cx43, sendo portanto, um mediador importante para manutenção da comunicação intercelular a partir de junções do tipo *Gap* (Hurst e cols, 1999). Além disso, na infecção por *T. cruzi*, ocorre uma redução da plasticidade dos cardiomiócitos pela perda de contatos celulares. Este fenômeno pode ser mediado por alterações na expressão e na organização estrutural das proteínas de junções do tipo *Gap*, como as conexinas (Campos de Carvalho e cols, 1992; Adesse e cols, 2008), na qual TGF- β parece estar envolvido (Waghabi e cols, 2009b). Nosso grupo observou que células miocárdicas de pacientes ou de modelos experimentais *in vitro* submetidas aos efeitos de níveis elevados de TGF- β sofrem alterações no padrão de distribuição de Cx43. Estas alterações podem estar relacionadas ao comprometimento da condutividade elétrica no coração, acarretando num aumento de focos de necrose, favorecendo indiretamente, ao desenvolvimento da fibrose no miocárdio (Waghabi e cols, 2009b).

Pela técnica de imunofluorescência, observamos no tecido cardíaco dos camundongos infectados por *T. cruzi* uma diminuição e desorganização da marcação de Cx43, semelhante ao descrito no coração de pacientes com CCC (Waghabi e cols, 2009b). Tal redução também foi confirmada quantitativamente pela técnica de *western blot*. Nosso estudo revelou ainda, que o **Tratamento I** protegeu o tecido cardíaco contra a perda de placas de conexinas, demonstrando uma preservação tecidual. Sabe-se que alterações na comunicação em junções do tipo *gap* podem gerar distúrbios na propagação do impulso elétrico entre os cardiomiócitos e causar arritmias cardíacas (Peters e cols, 1993). Além disso, a expressão de Cx43 cardíaca está diretamente relacionada à capacidade contrátil dos cardiomiócitos, como demonstrado em diferentes modelos de dano cardíaco (Haefliger e Meda, 2000; Lin e cols, 2005).

Estudos prévios em modelos experimentais têm evidenciado que a produção endógena de NO é essencial não somente para inibir o desenvolvimento do

parasito no tecido cardíaco, mas também para controlar o desenvolvimento da cardiomiopatia (revisto em Machado e cols, 2010). Desta forma, visando à compreensão de possíveis mecanismos envolvidos na regulação de TGF- β , foi realizada uma cinética da concentração plasmática de NO durante o curso da infecção experimental aguda frente ao tratamento com GW-788388.

Em diversos modelos de infecção experimental pelo *T. cruzi*, observa-se uma forte resposta inflamatória, envolvendo a participação de citocinas como TNF- α , IL-12 e IFN- γ e moléculas de NO (Chandra e cols, 2002; Gutierrez e cols, 2009). Já foi demonstrado que TGF- β inibe a produção de NO, pelo aumento de arginase que desvia a via de L-arginina para a de L-ornitina (Luo e Chen, 2005). Em nosso estudo, observamos que os níveis de NO estão aumentados nos animais que tiveram a via de TGF- β bloqueada (**Tratamento I**). Dessa forma, a resistência à infecção pelo *T. cruzi* poderia estar associada à capacidade dos linfócitos em produzirem IFN- γ , o que por sua vez, podem ativar os macrófagos a produzirem NO, uma das principais moléculas efetoras que controlam a multiplicação intracelular do parasito (Costa e cols, 2006; Almeida-Leite e cols, 2007). Sendo o TGF- β um importante regulador antiinflamatório, é possível que o comprometimento das funções biológicas de TGF- β por GW-788388, favoreça o controle parasitário por macrófagos ativados, principalmente pela via de ativação de NO. Em um modelo de fibrose induzida pela infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*, Hesse e cols (2000) demonstraram que a enzima iNOS (Óxido nítrico sintase induzível) é responsável pelos efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos atribuídos a uma resposta Th1.

Para analisar a capacidade de reversão dos danos provocados pela infecção via bloqueio de TGF- β , administramos o composto GW-788388 em um momento mais tardio da infecção aguda, no 13^o dpi (**Tratamento II**). Nossos resultados não identificaram melhora nos níveis de parasitismo cardíaco e no número de infiltrados inflamatórios no coração dos animais infectados tratados. Apesar do tecido cardíaco desses animais apresentar danos provocados pela resposta inflamatória e/ou pelo parasitismo, a análise dos traçados eletrocardiográficos revelou que o **Tratamento II** minimizou as alterações elétricas ocasionadas pela infecção. Essa melhora incluiu recuperação parcial da frequência cardíaca e dos intervalos PR e

QT. A redução na duração do intervalo PR indica que pode estar ocorrendo uma recuperação do tecido fibroso na região atrioventricular dos animais tratados e redução do intervalo QT indica uma melhora na repolarização ventricular e uma diminuição do risco de morte súbita. Apesar destes resultados indicarem um efeito positivo do composto, percebemos um aumento da mortalidade dos animais submetidos ao tratamento.

Avaliamos ainda no presente estudo, os níveis séricos de alguns parâmetros de lesão renal e hepática no 15^o dpi, a fim de verificar um possível efeito tóxico apresentado pelo **Tratamento II** que justificasse o aumento da taxa de mortalidade observado. Danos hepáticos causados pela infecção por *T. cruzi*, como os apresentados neste trabalho, são conhecidos em humanos e em modelos experimentais (Sardinha e cols, 2006; Russo e cols, 1996; Buckner e cols, 1999). No presente trabalho observamos que quando utilizamos o esquema de **Tratamento II**, o bloqueio da atividade de TGF- β acentuou a hepatite no 15^o dpi, caracterizada pelo aumento de infiltrados inflamatórios focais e uma intensa área de fibrose, além de um aumento de 8 vezes nos indicadores de dano hepático (AST e ALT) em comparação aos camundongos normais. Esses resultados sugerem que o **Tratamento II** aumentou a disfunção hepática ocasionada pela infecção por *T. cruzi*, podendo estar causando o aumento da mortalidade observada nesses animais. Esse fenômeno pode estar relacionado à importância do TGF- β no balanço de citocinas neste momento da infecção, uma vez que estudos têm mostrado que a exacerbação de fatores envolvidos na resposta inflamatória do tipo Th1 durante a infecção por *T. cruzi* pode levar a um aumento da inflamação hepática e com isso, elevar a taxa de mortalidade (Roggero e cols, 2002; Ronco e cols, 2010). Além disso, neste período, é bastante provável que os animais estejam em choque metabólico, com redução das atividades funcionais hepáticas e renais, o que poderia prejudicar a correta detoxificação do composto, contribuindo para a mortalidade dos animais.

Outro órgão que teve sua função analisada foi o rim, através da dosagem dos níveis séricos de ureia circulante. Animais infectados pelo *T. cruzi* apresentam lesões nos túbulos renais e alterações na função renal e possivelmente contribuindo para o aumento da mortalidade observada durante a fase aguda da infecção (Oliveira e cols, 2009). Observamos que no 15^o dpi os níveis de ureia

estavam aumentados nos animais infectados, indicando dano renal e que o bloqueio da atividade de TGF- β no 13^o dpi foi capaz de reverter esse dano. Sharma e cols (2005) mostraram que TGF- β está relacionado à perda de autoregulação renal, dessa forma o bloqueio de sua atividade no presente estudo pode ter relação com a melhora da função renal.

Como o tratamento no 13^o dpi apresentou elevada mortalidade, os animais foram submetidos a outro esquema de tratamento com a administração do composto no 20^o dpi, período esse em que não observamos mais ninhos de amastigotas, e a intensa inflamação no tecido cardíaco, embora já ocorra intenso processo fibrótico.

O Tratamento III se mostrou capaz de interromper a mortalidade dos animais, mesmo após o período mais crítico da infecção aguda experimental (entre o 15^o e 20^o dpi), quando a miocardite aguda já está instalada. A fim de verificar se o bloqueio da atividade de TGF- β seria capaz de reverter estes processos fibróticos, avaliamos os níveis de colágeno no tecido cardíaco. Nossos estudos mostraram que no 24^o dpi os níveis de colágeno dos animais infectados estão elevados e que o tratamento com o composto é capaz de reduzi-los significativamente, evidenciando o efeito antifibrótico do bloqueio da atividade de TGF- β .

Além do aparente efeito benéfico da inibição das funções de TGF- β para a redução da fibrose durante a infecção aguda no modelo experimental deste estudo, diversos modelos murinos de fibrose experimental têm visualizado os efeitos benéficos da inibição de TGF- β na redução ou mesmo na reversão da fibrose (Benigni e cols, 2003; Waghbi e cols, 2009a; revisto em Varga e Pashe, 2009). Recentemente, Tan e cols (2010) mostraram em um modelo com ratos de fibrose cardíaca, induzida por infarto do miocárdio, que o tratamento com GW-788388 reduz a quantidade de tecido fibrosado e também melhora os danos de condução cardíaca por ele gerados.

A fim de avaliar se o efeito protetor observado com o **Tratamento III** estaria relacionado ao aumento dos níveis de NO, conforme demonstrado com o **Tratamento I**, os níveis circulantes de NO foram medidos no 24^o dpi. Percebemos um aumento significativo de seus níveis. Alguns autores têm sugerido que NO e TGF- β possuem funções antagonistas no reparo de lesões musculares, sendo TGF- β estimulador de fibrose e NO do processo de regeneração do tecido

(Darmani e cols, 2004; Filippin e cols, 2011). Os mecanismos pelos quais NO regula o reparo tecidual e impede a geração de fibrose ainda não estão esclarecidos, mas tem sido sugerido que NO participa da regulação de metaloproteases de matriz e da ativação de células satélites que são células ainda indiferenciadas que têm o papel de restaurar lesões teciduais (Filippin e cols, 2011; Tatsumi e cols, 2009).

Dessa forma, é possível que a elucidação do papel dos fibroblastos, das citocinas e das metaloproteases na mediação da resposta antifibrinogênica em pacientes com miocardiopatia chagásica possa ter implicações importantes para o desenvolvimento de terapias capazes de proteger o hospedeiro contra a patologia cardíaca induzida pelo *T. cruzi*.

Em resumo, nosso estudo demonstrou que o bloqueio da atividade de TGF- β , utilizando um inibidor competitivo de T β RI e T β RII (GW-7883888) em uma única dose, não só é capaz de inibir o desenvolvimento da fibrose, assim como também tem a capacidade de reverter a deposição de colágeno já instalada. Sabe-se que uma das principais complicações da cardiopatia chagásica crônica, é a insuficiência cardíaca com presença de extensa fibrose (Higuchi e cols, 1999) e arritmias cardíacas (Casado e cols, 1990), associadas a níveis de TGF- β circulantes elevados (Araújo-Jorge e cols, 2002). Sendo assim, a inibição da atividade de TGF- β poderia melhorar esse quadro característico da fase crônica da doença de Chagas.

Com base em todas essas informações, a inibição farmacológica da atividade de TGF- β consiste em uma promissora abordagem para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica. Apesar disso, é importante ressaltar também que devido a multifuncionalidade de TGF- β e do seu papel fundamental nas respostas fisiológicas, o bloqueio global da atividade de TGF- β poderia ter consequências indesejadas.

Em particular, como a citocina TGF- β é um dos imunossupressores naturais mais potentes, a revogação completa da sinalização de TGF- β poderia levar ao desencadeamento de patologias de caráter autoimune devido à ativação espontânea de linfócitos T e B e à inibição da função de células T regulatórias e da resposta inflamatória. Dessa forma, apesar de muitos cientistas demonstrarem

interesse pelo uso do bloqueio das funções de TGF- β como terapia para várias patologias, como cancer e fibrose, é preciso estudar com cautela doses e esquemas de tratamento ideais que minimizem eventuais reações secundárias decorrentes do tratamento crônico.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O tratamento com a GW-788388, administrado por via oral e intraperitoneal, foi capaz de reduzir os níveis de parasitemia, e aumentou parcialmente a sobrevivência dos animais infectados pelo *T. cruzi*;
- ✓ O bloqueio da atividade de TGF- β pelo uso de GW-788388 no 3º dpi, também foi capaz de reduzir o parasitismo tissular e inflamação no coração e fígado, os níveis sanguíneos de AST, ALT e ureia, além de inibir a deposição de colágeno I e fibronectina no coração, apontando para um efeito protetor de danos cardíaco, hepático e renal;
- ✓ O tratamento dos animais (3º e 13º dpi) recuperou significativamente os danos de condução elétrica como duração do intervalo QT e frequência cardíaca, indicando uma melhora na anormalidade de repolarização ventricular e bradicardia, observados frente à infecção pelo *T. cruzi*;
- ✓ A recuperação parcial da expressão de conexina-43 no coração dos animais infectados e tratados demonstrou o papel protetor do GW-788388 na manutenção da estrutura de placas de junções do tipo *Gap*;
- ✓ O bloqueio de TGF- β pelo GW-788388 aumentou os níveis de óxido nítrico ao longo da infecção experimental aguda pelo *T. cruzi*, favorecendo uma atividade tripanocida, e provavelmente regulando a expressão de citocinas inflamatórias;
- ✓ A inibição da atividade de TGF- β no 13º dpi não foi capaz de alterar o parasitismo tissular, e inflamação no coração e no fígado. Por outro lado, aumentou a mortalidade dos animais tratados, possivelmente devido ao importante papel do TGF- β neste momento da infecção e ao aumento da lesão hepática;

- ✓ A diminuição da expressão de colágeno I pelo bloqueio de TGF- β no 20^o dpi, sugere a eficiência deste tratamento em reverter a deposição de componentes de matriz extracelular no tecido cardíaco, o que pode favorecer a maior sobrevida, indicando que este composto é promissor no tratamento da fibrose cardíaca observada na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001 Aug; 17(1): 99-107.

Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol.* 1996; 84: 231-44.

Adesse D, Garzoni LR, Huang H, Tanowitz HB, de Nazareth Meirelles M, Spray DC. *Trypanosoma cruzi* induces changes in cardiac connexin43 expression. *Microbes Infect.* 2008 Jan; 10(1): 21-8.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 1996; 64: 1961-67.

Almeida-Leite CM, Galvão LM, Afonso LC, Cunha FQ, Arantes RM. Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Neurobiol Dis.* 2007 Jan; 25(1): 170-8.

Andrade, SG, Grimaud, JA, Stocker-Guerret, S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Mar; 40(3): 252-60.

Andrade, ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 Suppl 1: 71-80.

Araújo-Jorge TC, Sampaio EP, De Souza W, Meirelles M de N. *Trypanosoma cruzi*: the effect of variations in experimental conditions on the levels of macrophage infection in vitro. *Parasitol Res.* 1989; 75(4): 257-63.

Araújo-Jorge TC, Waghahi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi M de L, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2002 Dec 15; 186(12): 1823-8.

Araujo-Jorge TC, Waghahi MC, Soeiro M de N, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic cardiomyopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Oct-Dec; 19(5-6): 405-13.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, et al. A 9,000 year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 2034-39.

Barolo, S, Stone, T, Bang, AG, Posakony, JW. Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev.* 2002 Aug 1; 16(15): 1964-76.

- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasc AC, Cazzulo JJ, Krishns S. The trypanosomiasis. *Lancet*. 2003; 362: 1469-1480.
- Batista Dda G, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro Mde N. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jul; 54(7): 2940-52.
- Benigni A, Zoja C, Corna D, Zatelli C, Conti S, Campana M, Gagliardini E, Rottoli D, Zanchi C, Abbate M, Ledbetter S, Remuzzi G. Add-on anti-TGF-beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jul; 14(7): 1816-24.
- Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21: 476-82.
- Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy-where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Jan-Feb; 52(4): 300-16.
- Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med*. 2008 Sep; 8(6): 510-8.
- Bonnaud P, Maretts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, Murphy A, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, Protter AA, Gaudie J. Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 889-898.
- Braga MS, Lauria-Pires L, Argañaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira AR. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000 May-Jun; 42(3): 157-61.
- Brener Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (eds.), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan, 379-388, 2000.
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1962 Nov-Dec; 4: 389-96
- Buckner FS, Wilson AJ, Van Voorhis WC. Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. *Infect Immun*. 1999 Jan; 67(1): 403-9.
- Bunch TJ, Mahapatra S, Bruce GK, Johnson SB, Miller DV, Horne BD, Wang XL, Lee HC, Caplice NM, Packer DL. Impact of transforming growth factor-beta1 on atrioventricular node conduction modification by injected autologous fibroblasts in the canine heart. *Circulation*. 2006 May 30; 113(21): 2485-94.

- Bustamante JM, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Ricardo F, d'Oro Gloria DL, Palma JA, Paglini-Oliva PA. *Trypanosoma cruzi* reinfections provoke synergistic effect and cardiac beta-adrenergic receptors' dysfunction in the acute phase of experimental Chagas' disease. *Exp Parasitol.* 2003 Mar-Apr; 103(3-4): 136-42
- Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, Harrington FP, Heer J, Kwon C, Lehr R, Mathur A, Olson BA, Weinstock J, Laping NJ. Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J Med Chem.* 2002 Feb 28; 45(5): 999-1001.
- Campos de Carvalho A, Tanowitz HB, Wittner M, Dermietzel R, Roy C, Hertzberg EL, Spray DC. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. *Circ Res.* 1992 Apr; 70(4): 733-42.
- Carrera-Silva EA, Carolina CR, Natalia G, Pilar AM, Andrea P, Gea S. TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Mol Immunol.* 2008 Aug; 45(13): 3580-8.
- Casado J, Davila DF, Donis JH, Torres A, Payares A, Colmenares R, Gottberg CF. Electrocardiographic abnormalities and left ventricular systolic function in Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 1990 Apr; 27(1): 55-62.
- Chagas C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1: 159-218.
- Chagas CRJ. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanosomíase americana. Retrospecto histórico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1922; 15: 67-76.
- Chagas CRJ. Moléstia de Carlos Chagas ou Thyreoidite Parasitária. Nova doença humana transmitida pelo barbeiro (*Conorhinus megistus*). II Conferência na Academia Nacional de Medicina. Rio de Janeiro: Tipografia Leuzinger, 20, 1911.
- Chagas' Disease Argentine Collaborative Transplant Consortium & Casadei D. Chagas' Disease and Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc.* 2010 Nov; 42(9): 3354-9.
- Chandra M, Tanowitz HB, Petkova SB, Huang H, Weiss LM, Wittner M, Factor SM, Shtutin V, Jelicks LA, Chan J, Shirani J. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int J Parasitol.* 2002; 32: 897-905.
- Cimo PL, Luper WE, Scouros MA. Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case. *Tex Med.* 1993; 89: 48-50.
- Costa VM, Torres KC, Mendonça RZ, Gresser I, Gollob KJ, Abrahamsohn IA. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2006 Sep 1; 177(5): 3193-200

- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug; 115(1-2): 5-13.
- Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002 Jan; 97(1): 3-24.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 2010 Jun; 465: S6–S7.
- Coura JR. A historical review of Chagas disease. In Gilles HM, *Protozoal Diseases.* London: Ed. Arnold. 1999; 306-312.
- da Silva CF, Batista MM, Batista Dda G, de Souza EM, da Silva PB, de Oliveira GM, Meuser AS, Shareef AR, Boykin DW, Soeiro Mde N. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sep; 52(9): 3307-14.
- Darmani H, Crossan J, McLellan SD, Meek D, Adam C. Expression of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in crush-injured tendon and synovium. *Mediators Inflamm.* 2004 Dec; 13(5-6): 299-305.
- de Carvalho, TU & de Souza, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986 Jul-Aug; 28(4): 205-12.
- de Gouville AC, Boullay V, Krysa G, et al. Inhibition of TGF-beta signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis. *J Pharmacol.* 2005; 145: 166-177.
- De Souza EM, Oliveira GM, Soeiro MNC Electrocardiographic findings in acutely and chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice treated by a phenyl-substituted analogue of furamidine DB569. *Drug Targets Insights.* 2007; 2: 61-69.
- de Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design.* 2002; 8(4): 269-285.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003 Oct 9; 425(6958): 577-84.
- Dias JC. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102: 11-18.
- Dias JCP, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(suppl 1): 103-121
- Dias JCP. Carlos Chagas: alguns aspectos históricos. *Revista de Patologia Tropical.* 2000; 29: 19-29.

- Dias JCP. Notes about of *Trypanosoma cruzi* ad yors bio-ecolgy characteristics with agents of the transmission by meals. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006; 39(4): 370-375.
- Dodd RY. Current safety of the blood supply in the United States. *International Journal of Hematolog.*, 2004; 80(4): 301-305.
- Dorn PL, Perniciaro L, Yabsley MJ, Roelling DM, Balsamo G, Diaz J, Wesson D. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 605-607
- Dubner S, Schapachnik E, Riera AR, Valero E. Chagas disease: state-of-the-art of diagnosis and management. *Cardiol J*. 2008; 15: 493-504.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998 Sep; 12(12): 1063-73.
- Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21: 287-92.
- Filippin LI, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Gallego J, Xavier RM. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide*. 2011 Jan 1; 24(1): 43-9.
- Fu K, Corbley MJ, Sun L, et al. SM16, an orally active TGF-beta type I receptor inhibitor prevents myofibroblast induction and vascular fibrosis in the rat carotid injury model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 665-671.
- Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, et al. Treatment with anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGFbeta signaling. *Kidney Int*. 2004; 65: 63-74.
- Gallerano RH, Marr JJ, Sosa RR. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 43: 159-166
- Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 1521-28.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *European Journal of Immunology*. 1992; 22: 2501-2506.

- Gellibert F, de Gouville AC, Woolven J, Mathews N, Nguyen VL, Bertho-Ruault C, Patikis A, Grygielko ET, Laping NJ, Huet S. Discovery of 4-{4-[3-(pyridin-2-yl) -1H-pyrazol -4- yl] pyridine -2- yl} -N- (tetrahydro -2H- pyran -4- yl) benzamide (GW788388): a potent, selective, and orally active transforming growth factor-beta type I receptor inhibitor. *J Med Chem.* 2006 Apr 6; 49(7): 2210-21.
- Gharaee-Kermani M, Phan SH. Role of cytokines and cytokine therapy in wound healing and fibrotic diseases. *Curr Pharm Des.* 2001 Jul; 7(11): 1083-103. Review.
- Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Miyague N, Francisco JC, Olandoski M, Faria-Neto JR, Brofman P. Simultaneous autologous transplantation of cocultured mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine model of Chagas disease. *Circulation.* 2006 Jul 4; 114(1 Suppl): I120-4.
- Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (suppl 1): 236–45.
- Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003 Dec; 54(4): 469-87.
- Haefliger JA, Meda P. Chronic hypertension alters the expression of Cx43 in cardiovascular muscle cells. *Braz J Med Biol Res.* 2000 Apr; 33(4): 431-8.
- Hall, BS & Pereira, MA. Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect Immun.* 2000 Apr; 68(4): 2077-81.
- Hall, SW, LaMarre, J, Marshall, LB, Hayes, MA, Gonias, SL. Binding of transforming growth factor-beta 1 to methylamine-modified alpha 2-macroglobulin and to binary and ternary alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes. *Biochem J.* 1992 Jan 15; 281(Pt 2): 569-75.
- Henning RJ. Stem cells in cardiac repair. *Future Cardiol.* 2011 Jan; 7(1): 99-117.
- Hesse M, Cheever AW, Jankovic D, Wynn TA. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am J Pathol.* 2000 Sep; 157(3): 945-55.
- Higuchi ML, Fukasawa S, De Brito T, Parzianello LC, Bellotti G, Ramires JA. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart.* 1999 Sep; 82(3): 279-85.
- Hurst V IV, Goldberg PL, Minnear FL, Heimark RL, Vincent PA. Rearrangement of adherens junctions by transforming growth factor-beta1: role of contraction. *Am J Physiol.* 1999 Apr; 276(4Pt1): L582-95.

Hwang M, Kim HJ, Noh HJ, Chang YC, Chae YM, Kim KH, Jeon JP, Lee TS, Oh HK, Lee YS, Park KK. TGF-beta1 siRNA suppresses the tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction. *Exp Mol Pathol* 2006; 81: 48-54.

Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 Nov; 14(6): 681-5.

Ishida W, Mori Y, Lakos G, Sun L, Shan F, Bowes S, Josiah S, Lee WC, Singh J, Ling LE, Varga J. Intracellular TGF-beta receptor blockade abrogates Smad-dependent fibroblast activation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*. 2006; 126: 1733-1744.

Juárez P, Vilchis-Landeros MM, Ponce-Coria J, Mendoza V, Hernández-Pando R, Bobadilla NA, López-Casillas F. Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292: F321–F329.

Karp CL, Auwaerter PG. Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. I. Protozoal pathogens. *Clin Infect Dis*. 2007 Nov 1; 45(9): 1208-13.

Kinoshita-Yanaga AT, Toledo MJ, Araújo SM, Vier BP, Gomes ML. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009 Sep-Oct;51(5):295-8.

Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, Paiva CN, Silva da AA. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors--how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul; 104 Suppl 1: 226-35.

Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simões-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira AR. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 63: 111-118.

Lawrence, DA. Transforming growth factor-beta: an overview. *Kidney Int Suppl*. 1995 Jun; 49: S19-23.

Leiby DA, Lenes BA, Tibbals MA, Tames-Olmedo MT. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J Med*. 1999; 341: 1237-39.

Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, Pialoux G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis*. 2010 Aug; 10(8): 556-70.

Letterio JJ, Roberts AB. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Sep; 84(3): 244-50.

- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal Experimental Medicine*. 1998; 168 (2): 649-659.
- Lijnen, PJ, Petrov, VV, Fagard, RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 2000 Sep-Oct; 71(1-2): 418-35.
- Lin LC, Wu CC, Yeh HI, Lu LS, Liu YB, Lin SF, Lee YT. Downregulated myocardial connexin 43 and suppressed contractility in rabbits subjected to a cholesterol-enriched diet. *Lab Invest*. 2005 Oct; 85(10): 1224-37.
- Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury. *Blood Purif*. 2010; 29(4): 357-65.
- Liu FY, Xiao L, Peng YM, et al. Inhibition effect of small interfering RNA of connective tissue growth factor on the expression of vascular endothelial growth factor and connective tissue growth factor in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Chin Med J (Engl)*. 2007; 120: 231-236.
- Lorena VM, Lorena IM, Braz SC, Melo AS, Melo MF, Melo MG, Silva ED, Ferreira AG, Morais CN, Costa VM, Correa-Oliveira R, Gomes YM. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*. 2010 Dec; 72(6): 529-39.
- Lorena VM, Verçosa AF, Machado RC, Moitinho-Silva L, Cavalcanti MG, Silva ED, Ferreira AG, Correa-Oliveira R, Pereira VR, Gomes YM. Cellular immune response from Chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Lab Anal*. 2008; 22(2): 91-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov; 193(1): 265-75.
- Ludlow A, Yee KO, Lipman R, Bronson R, Weinreb P, Huang X, Sheppard D, Lawler J. Characterization of integrin beta6 and thrombospondin-1 double-null mice. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr-Jun; 9(2): 421-37.
- Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin*. 2005 Mar; 26(3): 259-64.
- Lutz, M & Knaus, P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal*. 2002 Dec; 14(12): 977-88.
- Machado FS, Tanowitz HB, Teixeira MM. New drugs for neglected infectious diseases: Chagas' disease. *Br J Pharmacol*. 2010 May; 160(2): 258-9.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, Mattos AC, Rassi A, Morillo CA, Sosa-Estani S, Yusuf S; BENEFIT Investigators. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul; 104 Suppl 1: 319-24.

- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, et al, and on behalf of BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J.* 2008; 156: 37-43.
- Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun.* 1999; 67: 3864-71.
- Maruotti N, d'Onofrio F, Corrado A, Cantatore FP. Why TNF- α inhibition is not sufficient to avoid juxta-articular erosions in chronic arthritis? *Intern Emerg Med.* 2011 Feb 5; [Epub ahead of print].
- Massague, J & Chen, YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000 Mar 15; 14(6): 627-44.
- Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 753-91.
- McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versushost disease: a model for human scleroderma. *J Immunol.* 1999; 163: 5693-5699.
- Ming M, Ewen ME, Pereira ME. *Trypanosome* invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell.* 1995 Jul 28; 82(2): 287-96.
- Moon JA, Kim HT, Cho IS, Sheen YY, Kim DK. IN-1130, a novel transforming growth factorbeta type I receptor kinase (ALK5) inhibitor, suppresses renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2006; 70: 1234-1243.
- Mori Y, Ishida W, Bhattacharyya S, et al. Selective inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling blocks profibrotic transforming growth factor beta responses in skin fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 4008-4021.
- Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 2009 Nov; 136(22): 3699-714.
- Moustakas, A & Heldin, CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 2005 Aug 15; 118(Pt 16): 3573-84.
- Muñoz-Saravia SG, Haberland A, Wallukat G, Schimke I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev.* 2010 Dec 17 [Epub ahead of print].
- Murphy-Ullrich JE & Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000 Mar-Jun; 11(1-2): 59-69.

Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33: 407-411.

Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 653-55.

Oliveira GM, Masuda MO, Rocha NN, Schor N, Hooper CS, Araújo-Jorge TC, Henriques-Pons A. Absence of Fas-L aggravates renal injury in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Dec; 104(8): 1063-71.

Oliveira JS. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. *Am Heart J.* 1985; 110: 1092-1098.

OMS 2010 - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008 Mar 20; 245(3): 194-205.

Paiva CN, Pyrrho AS, Lannes-Vieira J, Vacchio M, Soares MB, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi* sensitizes mice to fulminant SEB-induced shock: overrelease of inflammatory cytokines and independence of Chagas' disease or TCR Vbeta-usage. *Shock.* 2003 Feb; 19(2): 163-8.

Peng SB, Yan L, Xia X, Watkins SA, Brooks HB, Beight D, Herron DK, Jones ML, Lampe JW, McMillen WT, Mort N, Sawyer JS, Yingling JM. Kinetic characterization of novel pyrazole TGF-beta receptor I kinase inhibitors and their blockade of the epithelial-mesenchymal transition. *Biochemistry.* 2005 Feb 22; 44(7): 2293-304.

Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* 2009; 72: 441-46.

Perico N, Benigni A, Remuzzi G. Present and future drug treatments for chronic kidney diseases: evolving targets in renoprotection. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Nov; 7(11): 936-53.

Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischaemic and hypertrophied human hearts. *Clin Sci (Lond).* 1996 Jun; 90(6): 447-52.

Petersen M, Thorikay M, Deckers M, van Dinther M, Grygielko ET, Gellibert F, de Gouville AC, Huet S, ten Dijke P, Laping NJ. Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int.* 2008; 73: 705-715.

Piek E, Heldin CH, Ten-Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* 1999 Dec; 13(15): 2105-24.

- Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Aug; 1792(8): 746-56.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001; 1: 92-100.
- Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*. 2007; 115: 279-283, 2007.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010 Apr 17; 375(9723): 1388-402.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul; 104 Suppl 1: 152-8.
- Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 1994; 153: 3135-40.
- Reesink HW. European strategies against the parasite transfusion risk. *Transfusion Clinique et Biologique : Journal de la Société Française de Transfusion Sanguine*. 2005; 12(1): 1-4.
- Reis MM, Higuchi Mde L, Aiello VD, Benvenuti LA. Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Nov-Dec; 33(6): 509-18.
- Roberts AB & Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*. 1993; 8(1): 1-9.
- Roggero E, Perez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, Serra E, Revelli S, Bottasso O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol*. 2002 Jun; 128(3): 421-8.
- Ronco MT, Francés DE, Ingaramo PI, Quiroga AD, Alvarez ML, Pisani GB, Revelli SS, Carnovale CE. Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice. *Cytokine*. 2010 Jan; 49(1): 64-72.
- Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004 Aug 15; 63(3): 423-32.
- Rossi MA & Bestetti RB. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology*. 1995; 86(1): 1-7.

Rossi MA. Connective tissue skeleton in the normal left ventricle and in hypertensive left ventricular hypertrophy and chronic chagasic myocarditis. *Med Sci Monit.* 2001; 7: 820-832

Rossi MA. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int J Cardiol.* 1998 Sep 30; 66(2): 183-94.

Russo M, Starobinas N, Marcondes MC, Minoprio P, Honteyberie-Joskowicz M. The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Immunol Lett.* 1996 Mar; 49(3): 163-8

Salas NA, Cot M, Schneider D, Mendoza B, Santalla JA, Postigo J, Chippaux JP, Brutus L. Risk factors and consequences of congenital Chagas' disease in Yacuiba, south Bolivia. *Tropical Medicine & International Health.* 2007; 12(12): 1498-505.

Sardinha LR, Elias RM, Mosca T, Bastos KR, Marinho CR, D'Império Lima MR, Alvarez JM. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2006 Apr; 74(4): 2031-42.

Scharfstein J, Morrot A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1999; 94: 51-63.

Schmunis GA, Zicker F, Pinheiro F, Brandling-Bennett D. Risk for transfusion-transmitted infectious diseases in Central and South America. *Emerg Infect Dis.* 1998 Jan-Mar; 4(1): 5-11.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102: 75-85.

Scorza C, Scorza JV. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1972 May-Jun; 14(3): 171-7.

Sharma K, Cook A, Smith M, Valancius C, Inscho EW. TGF-beta impairs renal autoregulation via generation of ROS. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 May; 288(5): F1069-77.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003; 113: 685-700.

Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Padua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 111-15.

Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Pádua MA. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Jan; 31(1): 111-5.

- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med*. 1991; 174: 539-45.
- Silva LHP, Nussenszweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol*. 1953; 20: 191-207.
- Silveira AC. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. *Cadernos de Saúde Pública*. 2000; 16(2): 35-42.
- Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 2001 Dec; 73(4): 547-59.
- Soares MB, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-de-Carvalho L, de Carvalho AC, Ribeiro-dos-Santos R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol*. 2004; 164(2): 441-7.
- Song YN, Zhang H, Zhao JY, Guo XL. Connexin 43, a new therapeutic target for cardiovascular diseases. *Pharmazie*. 2009 May; 64(5): 291-5.
- Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59: 526-9.
- Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, Cerban FM. Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:683485. Epub 2009 Dec 9.
- Tafuri WL, Maria TA, Lopes ER, Chapadeiro E. Electron microscopy of the myocardium in human trypanosomiasis cruzi. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1973; 15: 347-370
- Taipale, J, Saharinen, J, Hedman, K, Keski-Oja, J. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem*. 1996 Aug; 44(8): 875-89.
- Tan SM, Zhang Y, Connelly KA, Gilbert RE, Kelly DJ. Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 May; 298(5): H1415-25.
- Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis*. 2009 May-Jun; 51(6): 524-39.
- Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*. 2003 Oct; 19(10): 447-51.

Tatsumi R, Wuollet AL, Tabata K, Nishimura S, Tabata S, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Allen RE. A role for calcium-calmodulin in regulating nitric oxide production during skeletal muscle satellite cell activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 Apr; 296(4): C922-9.

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006b; 101: 463-491.

Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Posgrad Med.* 2006a; 82: 788-798.

Todaro, GJ, Fryling, C, De Larco, JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980 Sep; 77(9): 5258-5262.

Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, et al. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci.* 2005; 96: 791-800.

Torrico F, Castro M. Enfermedad de Chagas. In: Medicina tropical, CD-Rom, ITGPRESS; ISBN 90-76070-237; 2002.

Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, dos Santos RR, Dohmann HF, Krieger JE, Feitosa G, Vilas-Boas F, Oliveira SA, Silva SA, Bozza AZ, Borojevic R, de Carvalho AC. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart Study. *Trials.* 2007 Jan 18; 8:2.

Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernandes O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 291-97.

Varga J, Pasche B. Antitransforming growth factor-beta therapy in fibrosis: recent progress and implications for systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2008 Nov; 20(6): 720-8.

Varga J, Pasche B. Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009 Apr; 5(4): 200-6.

Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2007 Jun 14; 13(22): 3056-62.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas". *Mem. Inst Oswaldo Cruz.* 1911; 3: 276-92. On line access via [http://memorias.ioc.fiocruz.br/pdf/Tomo03/tomo03\(f2\)_276-294.pdf](http://memorias.ioc.fiocruz.br/pdf/Tomo03/tomo03(f2)_276-294.pdf)

Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Pinho-Filho JA, Mota A, Almeida AJ, Carvalho C, de Carvalho HG, de Oliveira AD, dos Santos RR. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.* 2004; 82: 185-187.

- Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ, Andrade MV, Carvalho HG, Dourado-Oliveira A, Ribeiro-dos-Santos R. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 87(2):159-66.
- Villalba R, Fornés G, Alvarez MA, Román J, Rubio V, Fernández M, García JM, Viñals M, Torres A. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin Infect Dis.* 1992; 14: 594-95.
- Vinhaes MC & Dias JCP. Chagas disease in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública.* 2000; 16(2): 7-12.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, et al. Long-term cardiac outcome of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 724-34.
- Waghabi MC, Coutinho-Silva R, Feige JJ, Higuchi Mde L, Becker D, Burnstock G, Araújo-Jorge TC. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor-beta treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009b Dec; 104(8): 1083-90.
- Waghabi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro Mde N, Meirelles Mde N, Paciornik S, Araújo-Jorge TC, Feige JJ. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol.* 2005a,167(4): 993-1003.
- Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazaré C Soeiro M, Mendonça-Lima L, Araújo-Jorge TC, Feige JJ, Bailly S. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Aug; 51(8): 2905-10.
- Waghabi, MC, de Souza, EM, de Oliveira, GM, Keramidas, M, Feige, JJ, Araujo-Jorge, TC. Pharmacological inhibition of Transforming Growth Factor beta signalling decreases infection and prevents heart damage in Acute Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009a Nov; 53(11): 4694-701.
- Waghabi, MC, Keramidas, M, Feige, JJ, Araujo-Jorge, TC, Bailly, S. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 2005b Apr; 7(4): 511-7.
- Waite, KA & Eng, C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet.* 2003 Oct; 4(10): 763-73.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jan 15; 14(2): 163-76.

Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 8015-8020.

8. ANEXOS

8.1 Manuscrito Submetido à Plos Neglected Tropical Diseases

Oral administration of GW788388, an inhibitor of Transforming Growth Factor

Beta signaling, restores heart fibrosis in Chagas Disease

Running Title: TGF- β Modulation Decreases Chagasic Heart Fibrosis

Fabiane L. de Oliveira^{1,2}, Elen M. de Souza², Gabriel M. de Oliveira², Wim M. Degraeve¹,
Tania C. Araújo-Jorge³, Jean-Jacques Feige^{4,5,6}, Sabine Bailly^{4,5,6*}, Mariana C. Waghbi^{1*}

¹Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, ²Laboratório de Biologia Celular, ³Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro RJ 20045-900, Brazil, ⁴INSERM, Unité 1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38054, France, ⁵UJF-Grenoble 1, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38041, France, ⁶CEA, DSV/iRTSV, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38054, France. * Co-last authors Address Correspondence to Sabine Bailly, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France Tel: (33) 0438789214; Fax: (33) 0438785058; E-mail: sbailly@cea.fr

Abstract

Background: Chagas' disease induced by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) infection is a major cause of mortality and morbidity affecting the cardiovascular system for which presently available therapies are largely inadequate. Transforming Growth Factor beta (TGF β) has been involved in several regulatory steps of *T. cruzi* invasion and in host tissue fibrosis. GW788388 is a new TGF β type I and type II receptor kinase inhibitor that can be orally administered. In the present work, we therefore studied its effects *in vivo* during the acute phase of experimental Chagas's disease.

Methodology/ Principal Findings: To do this, male Swiss mice were infected intraperitoneally with 10⁴ trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain) and evaluated clinically. We found that this compound given 3 days post infection (dpi) significantly decreased parasitemia, increased survival, and restored cardiac function as measured by electrocardiography. We

could further show that cardiac fibrosis development can be inhibited by this compound. Interestingly, we also demonstrated that administration of GW788388 at the end of the acute phase (20 dpi) still significantly increased survival and decreased cardiac fibrosis.

Conclusion/ Significance: Taken together, this work suggests that inhibition of TGF β signaling pathway could then be considered as an alternative strategy for the treatment of the symptomatic cardiomyopathy found in the acute and chronic phases of Chagas disease.

Author Summary

Cardiac damage and dysfunction are prominent features in patients with chronic Chagas disease, which is caused by infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and affects 10-12 million individuals in South and Central America. Our group previously reported that transforming growth factor beta (TGF β) is implicated in several regulatory aspects of *T. cruzi* invasion and growth and in host tissue fibrosis. We have evaluated the therapeutic action of an inhibitor of TGF β signaling (GW788388) administered during the acute phase of experimental Chagas' disease. GW788388 treatment significantly reduced mortality and decreased parasitemia. Electrocardiography showed that GW788388 treatment was effective in protecting the cardiac conduction system, preserving Gap junction plaques distribution, avoiding the development of cardiac fibrosis. Inhibition of TGF β signaling in vivo appears to potently decrease *T. cruzi* infection and to prevent heart damage in a preclinical mouse model. This suggests that this class of molecules may represent a new therapeutic agent for acute and chronic Chagas' disease that warrants further clinical exploration. TGF β inhibitors, administered at the chronic infection in mouse models should be further evaluated, and future clinical trials should be envisaged.

Introduction

Chagas' disease, caused by the intracellular kinetoplastid parasite *Trypanosoma cruzi*, is a widely spread distributed debilitating human illness, affecting 10-12 million people in Central and South America, being considered as a major cause of mortality and morbidity, killing 15,000 persons each year [1,2]. Chagas's disease presents an acute phase of infection that is characterized by mild clinical symptoms (fever and malaise) and high parasitemia, but is often passed unmarked. Patients usually enter the indeterminate stage of the infection, with low-level parasite persistence that can last from 10 to 40 years. About one in three infected individuals develops the symptomatic chronic stage of infection, which is characterized mainly by myocarditis or megacolon. A century has passed since the discovery of Chagas' disease and the development of an efficient drug is still a challenge. As other neglected diseases, it has not received much attention by the pharmaceutical industry and present available therapies are inadequate and insufficient [3]. Nifurtimox and benznidazole, the only two trypanocidic drugs available, have toxic side effects, are not effective for all parasite strains and are not fully effective for the chronic phase. Moreover, no therapeutic approach targeting Chagas' disease heart fibrosis is presently available.

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is the prototypic member of a family of polypeptide growth and differentiation factors that play a great variety of biological roles in such diverse processes as inflammation, fibrosis, immunosuppression, cell proliferation, cell differentiation, and cell death [4,5]. TGF- β is also involved in many direct and indirect interactions between infectious agents and their hosts [6]. Several studies have demonstrated that TGF- β plays a major role in the establishment and pathogenesis of *T. cruzi* infection (reviewed in [7]). Moreover, significantly higher circulating levels of TGF- β 1 have been observed in patients with Chagas' disease cardiomyopathy [8] and in a culture system of cardiomyocytes infected by *T. cruzi* [9]. In order to establish its biological functions, TGF- β

must be activated into a mature form mainly by proteases, allowing its interaction with a specific transmembrane receptor called TGF- β receptor- II (T β RII), which phosphorylates and stimulates the serine/threonine kinase activity of T β RI, also called activin receptor-like kinase 5 (ALK5). Upon activation, ALK5 phosphorylates the cytoplasmic signaling proteins Smad-2 and -3, which then associate with Smad-4, translocate into the nucleus as a multiprotein complex, and stimulate the transcription of TGF- β -responsive genes, thereby inducing specific biological responses.

We have recently described that the ALK5 inhibitor, 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide (SB431542) reduces the infection of cardiomyocytes by *T. cruzi* *in vitro* [10] and we could further show that it also inhibited *T. cruzi* infection *in vivo* and prevented heart damage in a preclinical mouse model [11]. This work therefore clearly demonstrated that blocking the TGF- β signaling pathway could be a new therapeutical approach in the treatment of Chagas's disease heart pathology. The limitation of this compound was that it had to be injected intraperitoneally and showed toxic effects. The aim of the present work was therefore to test another inhibitor of the TGF- β signaling pathway, 4-(4-[3-(Pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl] pyridin-2-yl)-N-(tetrahydro-2Hpyran-4-yl) benzamide (GW788388) which can be orally administrated and that has an improved pharmacokinetic profile. We also wanted to go further into the mechanism of protection by this compound. We found that GW788388 added 3-day post infection (dpi) decreased parasitaemia, increased survival, prevented heart damage, and decreased heart fibrosis. Interestingly, we also demonstrated that when added after the metabolic shock phase at 20 dpi, this compound could still decrease mortality and that this was probably due to a decrease in heart fibrosis.

Methods

Parasites: Bloodstream trypomastigotes of the Y strain were used and harvested by heart puncture from *T. cruzi*-infected Swiss mice at the parasitaemia peak, as described previously [12].

In vivo infection: Male Swiss mice (age 6-8 weeks, weight 18-20 g) were obtained from the animal facilities of CECAL (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil). Mice were housed for at least one week before parasite infection at the Animal Experimentation Section at Cell Biology Laboratory-IOC/FIOCRUZ under environmental factors and sanitation according to "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". Infection was performed by intraperitoneal (IP) injection of 10^4 bloodstream trypomastigotes. Age-matched non-infected mice were maintained under identical conditions. This project was approved by the FIOCRUZ Committee of Ethics in Research (protocol number 028/09).

Experimental groups: The animals were divided into the following groups: non-infected (NI), infected and untreated (Y DMSO), infected and treated with 3 mg/kg GW-783388 (Y GW783388). Ten mice from each group were used for analysis at each different dpi and 4 independent experiments were performed.

Drug and treatment: The compound GW783388 (GlaxoSmithkline, France) or vehicle dilution buffer (4% DMSO, 96% [0.5% Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), 5% Tween 20, 20% HCl 1M in NaH₂PO₄ 0.1M]) was used. Mice received GW783388 at 3mg/kg at 3dpi or 20 dpi by gavage in a single administration (0.2 mL). The control group received injection of vehicle buffer using the same schedule.

Survival rates and parasitaemia: Parasitaemia was individually checked by direct microscopic counting of parasites in 5 μ L of blood, as described previously [12]. Mortality was checked daily until 30 dpi and expressed as percentage of survival.

Biochemistry: Blood was collected from the tip of mice tails of all experimental groups at 15 dpi and immediately analyzed for the determination of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and urea levels with Reflotron Plus (Roche), according to the manufacturer recommendations. ALT and AST activities were used to evaluate hepatic dysfunction and the results were expressed as enzyme concentration (mg/dL). ALT and AST belong to the group of transaminase that catalyse the conversion of amino acids into corresponding α -ceto acids and vice-versa by transference of amine groups. Urea was measured to evaluate renal function and the results were expressed in concentration (mg/dL).

Histopathology: Fixed tissue was dehydrated and embedded in paraffin. Sections (3 μ m) stained by routine haematoxylin-eosin (HE) were analyzed by light microscopy. The number of amastigote nests and of inflammatory infiltrates (more than 10 mononuclear cells), were determined in 30 microscopic fields/slide (total magnification, 400x). The mean number of amastigotes or inflammatory infiltrates per field was obtained at 15 dpi from at least three infected mice, with three sections per mouse per group. The sections were observed using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled with Axiovision image acquisition system (Zeiss).

Histological assessment of cardiac fibrosis: Fixed tissue slides were obtained as described above and heart fibrosis was studied by collagen type-I and fibronectin immunostainings at 15 dpi. Briefly, after blocking with 3% BSA for 1 hour, the following primary antibodies were applied overnight to the sections: rabbit polyclonal anti-collagen type I (Novotec, France, kindly provided by Dr. Daniella Areas Mandes-da-Cruz (IOC/ FIOCRUZ)) and rabbit polyclonal anti-fibronectin (Sigma Aldrich, USA). The secondary antibody was Alexa 594 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen). Negative control sections were incubated with non-immune rabbit serum and the secondary antibody alone and indicated no cross reactivity (data not shown). Host-cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Heart fibrosis was also studied by Masson's trichrome staining at 15, 20 and 24 dpi as

previously described (28). Light blue areas were estimated as positive for the presence of fibrosis and a ranking was determined as negative (-), mild (+), moderate (++) and strong (+++). The sections were observed using a Zeiss Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled with Axiovision image acquisition systems.

Immunoblot analysis: Left ventricular heart proteins from each group (NI, Y DMSO and Y GW788388) were extracted from 100 mg tissue/mL phosphate-buffered saline, to which 0.4 mol/L sodium chloride, 0.05% Tween 20, and protease inhibitors (0.1mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride and 1/100 protease inhibitors cocktail (Sigma)) were added. The samples were sonicated twice and centrifuged for 10 min at 3000 *g*, and the supernatant was kept frozen at -70°C. Proteins in the lysates (20 µg/lane) were separated by SDS/PAGE and analyzed by immunoblotting with specific primary antibodies (rabbit Anti-fibronectin and rabbit Anti-connexin-43 from Sigma Aldrich and rabbit Anti-collagen type I from Novotec, France). To confirm equal protein loading, the same membranes were stripped and reprobed with a monoclonal antibody against GAPDH (Pierce).

Electrocardiography (ECG): ECG recording and analysis were performed in the three groups, as reported (30). Briefly, mice were fixed in the supine position, and transducers were carefully placed on the skin in accordance to chosen preferential derivation (lead II). Traces were recorded using a digital system (Power Lab 2/20) connected to a bio-amplifier in 2 mV for 1s (PanLab Instruments). Filters were standardized between 0.1 and 100 Hz and traces were analyzed using the Scope software for Windows V3.6.10 (PanLab Instruments). ECG parameters were evaluated in the acute phase at 15 dpi, using the following standard criteria: (i) the heart rate was monitored by beats/minute (bpm), and (ii) the variation at P wave and PR, QRS and QT intervals, all measured in milliseconds (ms).

Statistical analysis: Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (**), as determined by GraphPadPrism 4.0 software (Graph- Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Kaplan- Meier test was used to analyse the significances of the

survival rates while all the other analyses were performed using the non-parametric Mann–Whitney test.

Results

The aim of the present work was to evaluate whether the compound GW788388, which is an ATP-competitive inhibitor of the kinase activity of ALK5, could have a beneficial effect in vivo in an experimental model of mouse infection by *T. cruzi* and whether it could protect infected mice from parasite-induced alterations of cardiac functions and fibrosis.

Oral administration of GW788388 at 3 dpi reduced parasitaemia and heart damage in *T. cruzi* infected mice and increased mice survival rates

The inhibitor GW788388 was orally administered by force-feeding 3 dpi into male Swiss mice infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes of the Y strain. In this model, as previously described [11], parasitemia peaked at 8 dpi (Fig. 1A). GW788388 administration at 3 dpi significantly reduced the blood parasitemia peak at 8 dpi in *T. cruzi* infected mice ($p < 0.001$) (Fig. 1A). We also showed that GW788388 administration significantly increased survival rates at 30 dpi, 65 versus 34% on the non-treated group (Fig. 1B). These results were reproduced in 4 independent experiments. As expected, the infection induced a loss of body weight at 14 dpi [11] and this was not modified by the administration of GW788388 (data not shown). To investigate whether GW788388 treatment would also affect myocardial parasitism and infiltration of inflammatory cells, we analyzed infected heart sections collected at 15 dpi using histochemical techniques. Non-infected animals showed no inflammatory infiltration in the myocardium (data not shown). Myocardial sections from the *T. cruzi*-infected sham-treated group (Y DMSO) had numerous amastigote nests (Fig. 1C, open arrow) and large inflammatory foci (Fig. 1E, arrowhead) that were frequently associated with fibrotic areas. GW788388-treatment significantly decreased the number of the amastigote nests (Fig. 1D and 1G, $p < 0.001$). GW788388 administration also significantly decreased the number of inflammatory

infiltrates (Fig. 1F and 1H). A more detailed count of the number of cells in inflammatory foci showed that GW788388 treatment more particularly decreased the number of large inflammatory foci within the myocardium (larger than 20 or 50 cells per inflammatory infiltrates) (Table 1).

GW788388 controlled liver damage caused by acute experimental *T. cruzi* infection

T. cruzi infection induces a strong hepatitis during the acute phase of Chagas disease [13]. We therefore analyzed several parameters of the liver in sham-treated versus GW788388-treated mice. Analysis of liver sections at 15 dpi revealed the presence of large inflammatory infiltrates in DMSO-treated animals (Fig 2A, arrow). GW788388-administration significantly decreased the number of these infiltrates (Fig. 2B and C). We also measured two circulating markers that reflect liver status which are induced by *T. cruzi* infection: AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase). We found that GW788388-administration significantly decreased the serum levels of AST and ALT (Fig. 2D and E). We next measured urea, which reflects kidney status. Urea level was significantly increased at 15 dpi in DMSO-treated animals while GW788388 administration significantly reduced it (Fig. 2F).

GW788388 prevented heart damage from *T.cruzi* infection

We next analyzed electrocardiograms (ECG) of the different groups of mice at 15 dpi. As expected, analysis of the ECG demonstrated a clear sinus bradycardia in sham-treated *T. cruzi*-infected animals as compared to the non-infected control group (495.8 and 774 bpm, respectively). GW788388-administration significantly limited the bpm decrease, with a mean heart rate of 554.3 (Fig. 3A and Table 2). The other parameters analyzed demonstrated that infected-mice had higher QT, PR and QRS intervals compared to non-infected mice (Table 2). GW788388 administration significantly decreased the QT intervals to 25.33 ms as compared to 29.67 in the infected DMSO-treated group (Table 2) but did not significantly modify the PR and

QRS intervals. It has been already proposed that elevated TGF- β levels during *T. cruzi* infection disorganize gap junctions, possibly contributing to abnormal impulse conduction and arrhythmia in Chagas' disease [11]. To test this hypothesis we measured connexin 43 (Cx43) expression in the different groups of mice. Heart sections from at least three mice per group at 15 dpi were immunostained for Cx43. We observed by confocal microscopy that non-infected hearts presented a dense structure of gap junction plaques (Fig. 3B, green staining). A drastic change in Cx43 expression was observed in the infected hearts from vehicle-treated mice, with an important decrease in Cx43 expression and a disruption of gap junction plaques (Fig. 3C). In contrast, we observed that GW788388 treatment reduced Cx43 disassembly and prevented the dissolution of gap junctions, preserving organized plaques distribution (Fig. 3D). Immunoblotting analysis of proteins from heart ventricles confirmed these data (Fig. 3E and F).

GW788388 oral administration prevented heart fibrosis development in *T. cruzi*-infected mice

One of the best established biological function of TGF- β is the stimulation of extracellular matrix proteins deposition. Therefore we checked whether anti-TGF β treatment would affect heart fibrosis that occurs in response to *T. cruzi* infection. Left ventricular heart tissues were obtained from each group and the deposition of ECM proteins was studied by immunostaining for collagen type I and fibronectin at 15 dpi. We observed an interstitial fibrous heart with high levels of both collagen and fibronectin deposition, as observed in red on Figure 4A and C, respectively. Interestingly, we could show that oral administration of GW788388 significantly reduced collagen type I and fibronectin levels (Fig. 4B and D, respectively). These data was confirmed by immunoblotting analysis of proteins from heart ventricles (Fig. 4E, F and G).

Oral administration of GW788388 at 20 dpi increased mice survival rates in *T. cruzi* infected mice and reduced heart fibrosis

Because most of the beneficial effects that we observed here with the TGF- β inhibitor GW788388 might be due to the resulting decreased parasitaemia, we next studied the effect of GW788388 oral administration after the peak of parasitemia. We first administrated GW788388 at 13 dpi, when blood parasitaemia is still detectable but we did not observe any significant difference in survival rates when GW788388 was administrated at 13 dpi (data not shown).

Because at 13 dpi, mice are still undergoing a major metabolic shock, we next tried to add GW788388 at a later stage, i.e. at 20 dpi. At 20 dpi, only 18% of infected mice have survived and 30% of them will be dead at 24 dpi. Interestingly, we found that GW788388 administration at 20 dpi completely protected these mice (n =12) from death until 24 dpi (Fig.5A, inset). In the inset, 100 represent the percent survival calculated from 20 dpi. To verify if GW788388 treatment presented an effect in the reversion of installed fibrosis, we therefore performed Masson's trichrome staining on heart cross-sections of non-treated mice at 15 dpi (Fig. 5B), 20 dpi (Fig. 5C) and 24 dpi (Fig. 5D), and on GW788388-treated mice at 24 dpi (Fig. 5E). We observed a progressive increase in collagen deposition visualized as light blue staining, which followed the disease development (from 15 to 24 dpi, Table 3). At the treatment day with GW788388, 20 dpi, we observed a fibrotic pattern on the heart of infected mice frequently associated to inflammatory infiltrates (Fig. 5C). Interestingly, four days after GW788388 administration (24 dpi) we observed a decrease in collagen deposition (Fig. 5E) as compared to the non-treated group (Fig. 5D, Table 3). Immunoblotting assays were performed to compare the expression levels of type I collagen and we observed a significant increase in this protein expression in the DMSO infected group as compared to the non-infected group

(Fig. 5F and G, 9 fold increase, $p < 0.0001$), while GW788388 administration significantly decreased the expression levels of collagen (Fig. 5F and G; $p < 0.05$).

Discussion

We have recently demonstrated that inhibition of the TGF- β signaling pathway could decrease infection and prevent heart damage [11] suggesting that this new class of therapeutic agents should be considered in association with trypanocidal compounds, in the treatment of patients with Chagasic cardiomyopathy. In the present work, we demonstrated that a more potent class of inhibitors of the TGF- β signaling pathway, GW-788388, which could be orally administered, significantly decreased parasitaemia, increased survival and restored cardiac function as measured by electrocardiography. We also showed that cardiac fibrosis development is inhibited by this compound. Interestingly, we could further demonstrate that administration of GW788388 at 20 dpi, which is at the end of the acute phase, significantly increased survival and reversed the installed cardiac fibrosis. Taken together, these data further support that blocking TGF- β signaling could represent a new therapeutic approach for Chagas' disease heart fibrosis treatment.

It is now well established that the involvement of the TGF β signaling pathway plays an important role in the development of Chagas' disease [7]. TGF- β has been shown to be involved during parasite-host cell invasion, proliferation and differentiation [14,15,16,17]. Moreover, significantly higher circulating levels of TGF- β 1 have been observed in patients with Chagas' disease cardiomyopathy [8,18]. These data incited us to test the possibility of treating the development of Chagas's disease by blocking the TGF- β signaling pathway.

Several approaches have been developed to abrogate TGF- β signaling. Antibodies directed against TGF- β have been administered in diabetic rodents and this was shown to effectively prevent glomerulosclerosis and renal insufficiency [19]. Antisense TGF- β oligonucleotides were found to reduce kidney weight in diabetic mice [20]. Recently, a soluble fusion protein of the T β RII was reported to reduce albuminuria in a chemically induced model

of diabetic nephropathy in rats [21]. And finally, inhibitors of the kinase activity of the T β RI (ALK5) have been developed. These inhibitors interact with the ALK5 ATP-binding site, thereby preventing TGF- β intracellular pathways [22]. The first ALK5 inhibitor described, 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide (SB431542), is an ATP-competitive kinase inhibitor [23]. SB525334 was shown to significantly reduce procollagen α (I), in rat kidneys, in an induced model of nephritis. It was also described that SB431542 triggers antitumor activity in vivo (Tanaka et al, 2010). Our work also demonstrated that SB431542 reduced mortality, decreased parasitaemia and prevented heart damage as observed by histological and ECG analysis during the acute phase of experimental Chagas disease [11]. The limitation of SB431542 was that it had to be injected intraperitoneally and in vivo toxic effects have been demonstrated. Recently, GW788388 was developed as an alternative to SB431542 with better in vivo exposure. GW788388 is orally active and has a good pharmacokinetic profile [22,24,25]. GW788388 administration has been shown to reduce liver and renal fibrotic response in a model of chemical induced fibrosis in rats and in the db/db mouse model of spontaneous diabetic nephropathy [24,25]. Treatment with GW788388 also showed to be effective to prevent the fibrotic response on a skin fibrosis model [26] and attenuated cardiac dysfunction following myocardial infarction [27]. These data prompted us to test this compound during the acute phase of experimental Chagas disease.

We found that oral administration of GW788388 at 3 dpi significantly reduced peripheral parasitaemia and lowered parasite load in hearts of infected mice observed 15 dpi. This effect was achieved with lower administration doses (3mg/kg) than the one we previously used for SB431542 (10 mg/kg)[11], and with a single oral injection. More importantly, oral administration of GW788388 also significantly improved mice survival (70% in GW788388 treated mice against 30% in non-treated infected mice at 30 dpi). This is probably due to the combination of impairment of *T. cruzi* second wave infection due the decrease of parasitemia and balance of early inflammatory cytokines secretion. Infection with *T. cruzi* in the acute

phase is followed by a strong mononuclear cell inflammation on target tissues such as heart and liver, which could cause tissue disruption, necrosis followed to fibrosis deposition and abnormalities on electrical impulse conduction. Our data showed fewer inflammation on both studied tissues and moreover, less mononuclear cells by inflammatory focus. An improved ECG was also observed after GW788388 administration, characterized mainly by the absence of sinus node dysfunctions and reduced sinus bradycardia. PR intervals larger than 40 ms suggest slower transmission of the electrical impulses and atrioventricular block (AVB), which is characteristic of acute *T. cruzi* infection [28]. We observed an improvement on the QT intervals following GW788388 administration, which represent ventricular recuperation wave and this could be related to the decrease of sudden death [29] and to the progression to a pathological chronic phase [28]. Heart failure and sudden death are the most common causes of death in patients with Chagas disease [30] and altered ECG parameters correlates with increasing myocardial scar and decreasing myocardial function in these patients [31].

This results from disorganized gap junctions that could contribute to abnormal impulse conduction and arrhythmia that characterize severe cardiopathy in Chagas disease and heart fibrosis [9]. Gap junction Cx43 molecules are responsible for electrical impulse conduction in the heart [32] and are affected by TGF- β [9,33]. We observed that GW788388 treatment preserved a correct Cx43 plaque pattern in the heart and blocked the down-regulation of Cx43 expression commonly observed following *T. cruzi* infection. GW788388 treatment therefore favored a regular and correct electrical impulse transmission. TGF- β is also a key factor in the generation of tissue fibrosis [34] and has been correlated to development of Chagas disease manifestations and symptomatic cardiac chronic phase [7]. Our data showed that administration of GW788388 to *T. cruzi* infected mice significantly prevented the increase of fibronectin and type I collagen, two important components involved in heart fibrosis. These data are consistent with previous studies showing that GW788388 reduced fibrosis markers in the kidney following chemical-induced nephropathy [24,35].

In the acute phase of Chagas' disease, symptoms frequently pass unnoticed and it is therefore difficult to propose correct treatments with trypanocidal drugs. Therefore, in the present study, we also treated mice with GW788388 at the end of the acute phase, when the presence of circulating parasites is rare. Interestingly, we found that oral administration of GW788388 at 20 dpi completely protected mice from death (100% survival). Analysis of cardiac fibrosis by Masson's trichrome staining on heart cross-sections of *T. cruzi* infected mice showed a strong increase of fibrosis from 15 dpi to 24 dpi (Fig. 5, Table 3). Interestingly, we found that mice treated with GW788388 in a single dose scheme at 20 dpi reversed heart fibrosis when observed four days after (24 dpi) as compared to untreated infected mice. The level of type I collagen was also restored in GW788388 treated mice versus untreated mice. Taken together these data demonstrate that blocking TGF- β signaling can decrease installed heart fibrosis. This important finding encourages for further pre-clinical assays targeting fibrotic lesions that are always involved in the severity of the clinical picture observed in the chronic cardiac disease. The development of an efficient drug for Chagas' disease is still a challenge and trypanocidal drugs such as nifurtimox and benznidazole are still the only drugs employed for specific Chagas disease treatment, although the observation of serious side effects. Treatment strategy approaching the reversion of fibrosis has been demonstrated here at the end of the acute phase of experimental Chagas disease and should now be developed in a chronic experimental model and further in a clinical assay with chronic patients. The inhibition of TGF- β signalling pathway and its biological functions could then be considered as an alternative strategy for the treatment of the symptomatic cardiomyopathy found in the acute and chronic phases of Chagas disease, synergically with current administered drugs, enabling lower dosages and avoiding toxic effects.

References

1. Jannin J, Villa L (2007) An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 95-97.
2. Rassi A, Jr., Rassi A, Little WC (2000) Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23: 883-889.
3. Coura J, de Castro S (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24.
4. Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, Jakowlew S, Kondaiah P, et al. (1990) Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 327: 145-154.
5. Massague J, Gomis RR (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* 580: 2811-2820.
6. Reed SG (1999) TGF-beta in infections and infectious diseases. *Microbes Infect* 1: 1313-1325.
7. Araujo-Jorge TC, Waghabi MC, Soeiro Mde N, Keramidas M, Bailly S, et al. (2008) Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 405-413.
8. Araujo-Jorge TC, Waghabi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi Md Mde L, et al. (2002) Implication Of Transforming Growth Factor-beta1 In Chagas Disease Myocardiopathy. *J Infect Dis* 186: 1823-1828.
9. Waghabi MC, Coutinho-Silva R, Feige JJ, Higuchi Mde L, Becker D, et al. (2009) Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor-beta treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1083-1090.
10. Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazare CSM, et al. (2007) SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2905-2910.
11. Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, et al. (2009) Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4694-4701.
12. Olivieri BP, de Souza AP, Cotta-de-Almeida V, de Castro SL, Araujo-Jorge T (2006) *Trypanosoma cruzi*: alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. *Exp Parasitol* 114: 228-234.
13. Ronco MT, Frances DE, Ingaramo PI, Quiroga AD, Alvarez ML, et al. Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice. *Cytokine* 49: 64-72.
14. Ming M, Ewen ME, Pereira ME (1995) Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell* 82: 287-296.

15. Hall BS, Pereira MA (2000) Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect Immun* 68: 2077-2081.
16. Waghabi MC, Keramidas M, Feige JJ, Araujo-Jorge TC, Bailly S (2005) Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 7: 511-517.
17. Waghabi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonca-Lima L, et al. (2005) Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol* 167: 993-1003.
18. Waghabi MC, Coutinho CM, Soeiro MN, Pereira MC, Feige JJ, et al. (2002) Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin. *Infect Immun* 70: 5115-5123.
19. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, et al. (2000) Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8015-8020.
20. Han DC, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, Ziyadeh FN (2000) Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F628-634.
21. Russo LM, del Re E, Brown D, Lin HY (2007) Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)-beta1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy: amelioration by soluble TGF-beta type II receptor. *Diabetes* 56: 380-388.
22. Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, et al. (2002) Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J Med Chem* 45: 999-1001.
23. Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, et al. (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 62: 58-64.
24. Petersen M, Thorikay M, Deckers M, van Dinther M, Grygielko ET, et al. (2008) Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int* 73: 705-715.
25. Gellibert F, de Gouville AC, Woolven J, Mathews N, Nguyen VL, et al. (2006) Discovery of 4-[4-[3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]pyridin-2-yl]-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-

- yl)benzamide (GW788388): a potent, selective, and orally active transforming growth factor-beta type I receptor inhibitor. *J Med Chem* 49: 2210-2221.
26. Lagares D, Garcia-Fernandez RA, Jimenez CL, Magan-Marchal N, Busnadiego O, et al. Endothelin 1 contributes to the effect of transforming growth factor beta1 on wound repair and skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 62: 878-889.
 27. Tan SM, Zhang Y, Connelly KA, Gilbert RE, Kelly DJ (2010) Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1415-1425.
 28. Eickhoff CS, Lawrence CT, Sagartz JE, Bryant LA, Labovitz AJ, et al. (2010) ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *J Parasitol* 96: 758-764.
 29. Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, et al. (2003) Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* 108: 965-970.
 30. Manzullo EC, Chuit R (1999) Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 317-320.
 31. Strauss DG, Cardoso S, Lima JA, Rochitte CE, Wu KC (2011) ECG scar quantification correlates with cardiac magnetic resonance scar size and prognostic factors in Chagas' disease. *Heart* 97: 357-361.
 32. Severs NJ (2001) Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence? *J Cell Mol Med* 5: 355-366.
 33. Chanson M, Derouette JP, Roth I, Foglia B, Scerri I, et al. (2005) Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim Biophys Acta* 1711: 197-207.
 34. Tabibzadeh S (2002) Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty. *Front Biosci* 7: d1231-1246.
 35. Peng SB, Yan L, Xia X, Watkins SA, Brooks HB, et al. (2005) Kinetic characterization of novel pyrazole TGF-beta receptor I kinase inhibitors and their blockade of the epithelial-mesenchymal transition. *Biochemistry* 44: 2293-2304.

Acknowledgments:

This work was supported by an INSERM-FIOCRUZ collaborative research program, by grants from PAPES/FIOCRUZ, IOC, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho-FAPERJ to the Brazilian laboratories, and by recurrent funding from INSERM and

CEA to the French laboratory. The authors would like to thank Wanderson da Silva Batista for his technical help on animal care.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: GW788388 administration at 3 dpi decreases parasitemia and heart inflammatory infiltrates and increases survival rates caused by *T. cruzi* infection. Male Swiss mice were injected IP with 10^4 bloodstream trypomastigotes. Then GW788388 (3 mg/kg) or DMSO was administrated by gavage at 3 dpi. (A) Parasitaemia was measured by direct counting of parasites in blood. (B) Percent survival was monitored during the experiment until 30 dpi. (C-F) At 15 dpi, mice were sacrificed and heart sections stained by hematoxylin-eosin were analyzed by light microscopy. Large inflammatory infiltrates (C, open arrows) and numerous amastigote nests (E, filled arrows) were observed in non-treated *T. cruzi* infected mice. GW788388 administration decreased the number of inflammatory infiltrates (D, open arrows) and of amastigote nests (F). (G and H) The mean number of inflammatory infiltrates (more than 10 mononuclear cells) in 30 fields (G) and the mean number of amastigote nests in 30 fields (H) is shown. Values for the infected group treated with GW788388 that were significantly different ($P < 0.05$) from the value for the DMSO infected group are indicated (*).

Figure 2: GW788388 administration at 3 dpi decreased liver and renal damage caused by *T. cruzi* infection. Male Swiss mice were injected IP with or without (NI) 10^4 bloodstream trypomastigotes. Then GW788388 (3 mg/kg) or DMSO was administrated by gavage at 3 dpi. (A and B) At 15 dpi mice were sacrificed, and liver sections stained by hematoxylin-eosin were analyzed by light microscopy. (C) The mean number of inflammatory infiltrates (more than 10 mononuclear cells) in 30 fields is shown. (D and E) The serum levels of AST and ALT, two markers of hepatic lesion, were measured at 15 dpi. (F) The serum urea levels were measured to evaluate renal function. Each symbol shows the value for one mouse. The short black bars

show the mean value for each group. Values that were significantly different from studied groups are indicated by asterisks (** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$).

Figure 3: GW788388 administration at 3 dpi restored Electrocardiographic parameters and connexin 43 disruption caused by *T. cruzi* infection. Male Swiss mice were injected IP with or without (NI) 10^4 bloodstream trypomastigotes. Then GW788388 (3 mg/kg) (Y GW788388) or DMSO (Y DMSO) was administrated by gavage at 3 dpi. (A) Representative electrocardiographic tracings of the three groups at 15 dpi are shown. (B, C, and D) At 15 dpi, mice were sacrificed and heart sections stained with anti-Cx43 antibody (green, Cx43 plaques are indicated by white arrows) and DAPI (nuclei, colored in blue). (E) 20 μ g of total proteins from hearts at 15 dpi were resolved in 12% SDS/PAGE and immunoblotted with anti-Cx43 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies. (F) Densitometric histograms of the normalized levels of Cx43 as related to GAPDH are shown. Values that were significantly different from studied groups are indicated by asterisks (* $p < 0.05$).

Figure 4: GW788388 administration at 3 dpi decreased heart fibrosis caused by *T. cruzi* infection. Male Swiss mice were injected IP with 10^4 bloodstream trypomastigotes. Then GW788388 (3 mg/kg) (Y GW788388) or DMSO (Y DMSO) was administrated by gavage at 3 dpi. (A, B, C, and D) At 15 dpi, mice were sacrificed and heart sections stained anti-collagen type I antibody (A and B, open arrow) or anti-fibronectin antibody (C and D, white arrow), colored in red and DAPI (nuclei, colored in blue). (E) 20 μ g of total proteins from hearts at 15 dpi were resolved in 12% SDS/PAGE and immunoblotted with anti-fibronectin or anti-collagen type I antibodies and reprobated with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody. (F and G) Densitometric histograms of the normalized levels of fibronectin or collagen type I as related to GAPDH are shown. Values that were significantly different from studied groups are indicated by asterisks (** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$).

Figure 5: GW788388 administration at 20 dpi protected *T. cruzi* infected mice from death and decreased heart fibrosis. Male Swiss mice were injected IP with or without (NI) 10^4 bloodstream trypomastigotes. Then GW788388 (3 mg/kg) (Y GW788388) or DMSO (Y DMSO) was administered by gavage at 20 dpi. (A) Percent survival was monitored during the experiment until 24 dpi (Inset shows an amplification of the survival curve from 20 to 24 dpi (100 represents the percent survival calculated from 20 dpi)). (B, C, D, F) Non-treated infected mice were sacrificed at 15 dpi (B), 20 dpi (C), 24 dpi (D) and GW788388-treated mice at 20 dpi were sacrificed 24 dpi (E). Heart sections were stained for collagen deposition by Masson's trichrome (light blue staining, open arrows). (F) 20 μ g of total proteins from hearts at 24 dpi were resolved in 12% SDS/PAGE and immunoblotted with anti-collagen type I antibody and reprobated with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody. (G) Densitometric histograms of the normalized levels of collagen I as related to GAPDH are shown. Values that were significantly different from studied groups are indicated by asterisks (** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$).

Table 1. Number of inflammatory infiltrates in the heart at 15 dpi of mice infected with *T. cruzi* treated or not with GW783388 at 3 dpi

Number of cells by Inflammatory Infiltrates	Y DMSO	Y GW788388	Fold decrease	P value
10-20	73.17 \pm 28.18	65.83 \pm 18.25	1.1	0.68
21-50	66 \pm 19.67	24 \pm 10.54	2.75	0.002
>50	29.33 \pm 18.74	4.83 \pm 2.9	6.07	0.004
Total	168.5 \pm 45	94.67 \pm 29.34	1.78	0.008

Table 2. Electrocardiograph parameters of non-infected mice or *T. cruzi* infected mice at 15 dpi treated or not with GW788388 at 3 dpi.

ECG parameters Mean± SD	Non infected	Y DMSO	Y GW788388
Heart rate (bpm)	774.2±30.6	495.8±79.2 ^a	554.3±44.5 ^c
PR intervals (ms)	28.6±3.1	50.4±8.2 ^a	45.1±8.4
QRS intervals (ms)	8.6±1.4	10.6±2.7 ^b	9.7±2
QT intervals (ms)	22.8±8.9	29.6±5.5 ^b	25.3±6.4 ^c

ECG parameters were evaluated in the acute phase at 15 dpi, using the following standard criteria: (i) the heart rate was monitored by beats/minute (bpm), and (ii) the variation at P wave and PR, QRS and QT intervals, all measured in milliseconds (ms). Significant differences between the values for non-infected and infected groups of mice: ^a ($p<0.001$) and ^b ($p<0.05$). ^c Significant differences ($p<0.05$) between the values for Y DMSO and Y GW788388 groups of mice.

Table 3. Fibrosis scores on the heart of *T. cruzi* infected mice treated or not with GW788388 at 20 dpi

	dpi 15	dpi 20	dpi 24	dpi 24 GW788388
Number of mice	8	3	4	7
Masson' Trichrome	++	++	++	-
	+	+++	+++	-
	+++	++	+	++
	++		+++	-
	-			-
	++			-
	++			-
	nd			-
Score	1.5±1	2.3±0.6	2.25±0.9	0.33±0.8*

Individual classification of collagen deposition degree according to the extension of Masson' Trichrome stained area in the heart of mice infected by *T. cruzi* after 15 dpi, 20 dpi, 24 dpi and GW788388-treated mice at 24 dpi. Light blue areas were estimated as positive for the presence of fibrosis and a ranking was determined as negative (-), mild (+), moderate (++) and strong (+++). * Significant differences ($p < 0.05$) between the values for Y DMSO and Y GW788388 groups of mice observed at 24 dpi.

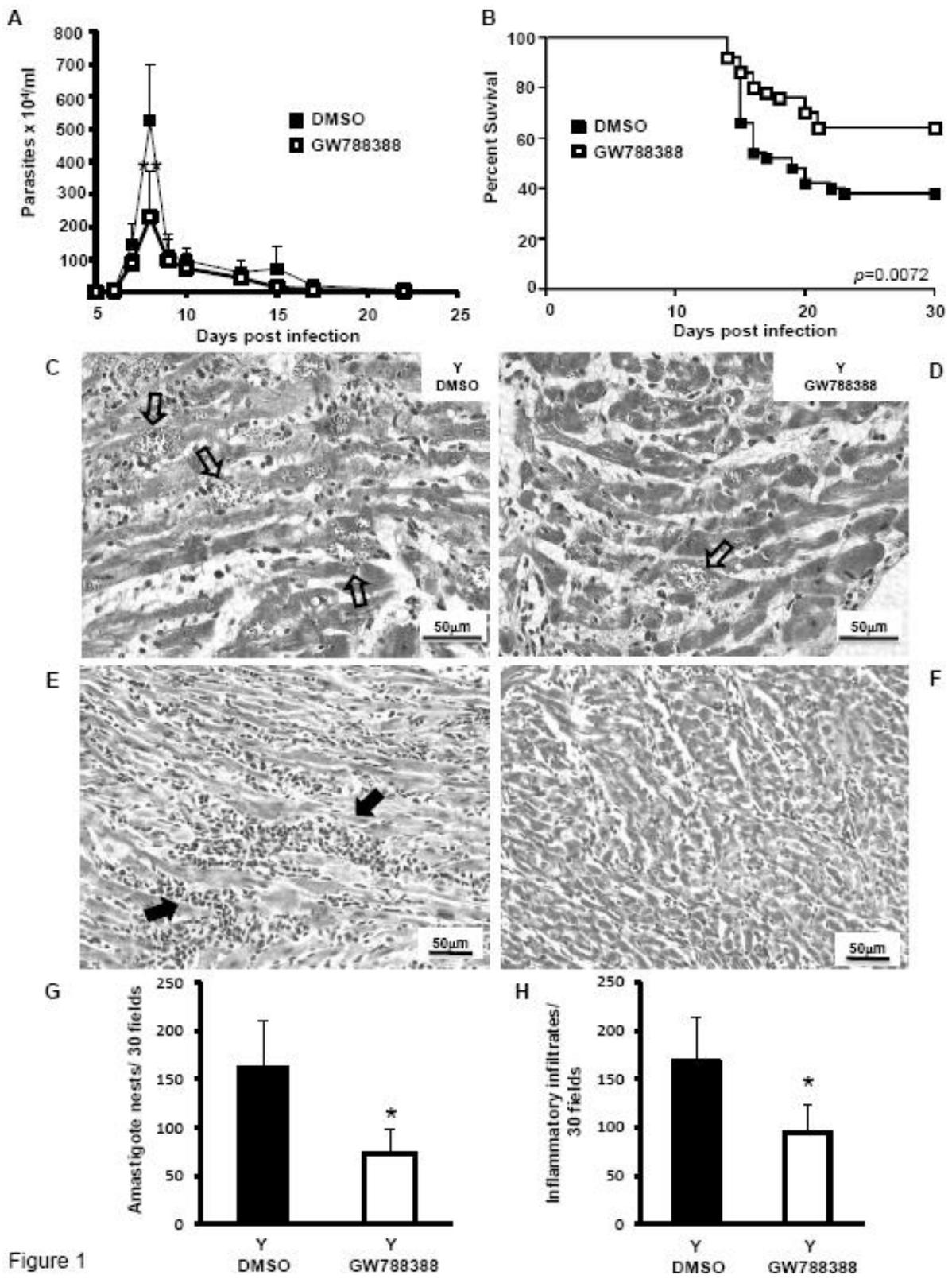


Figure 1

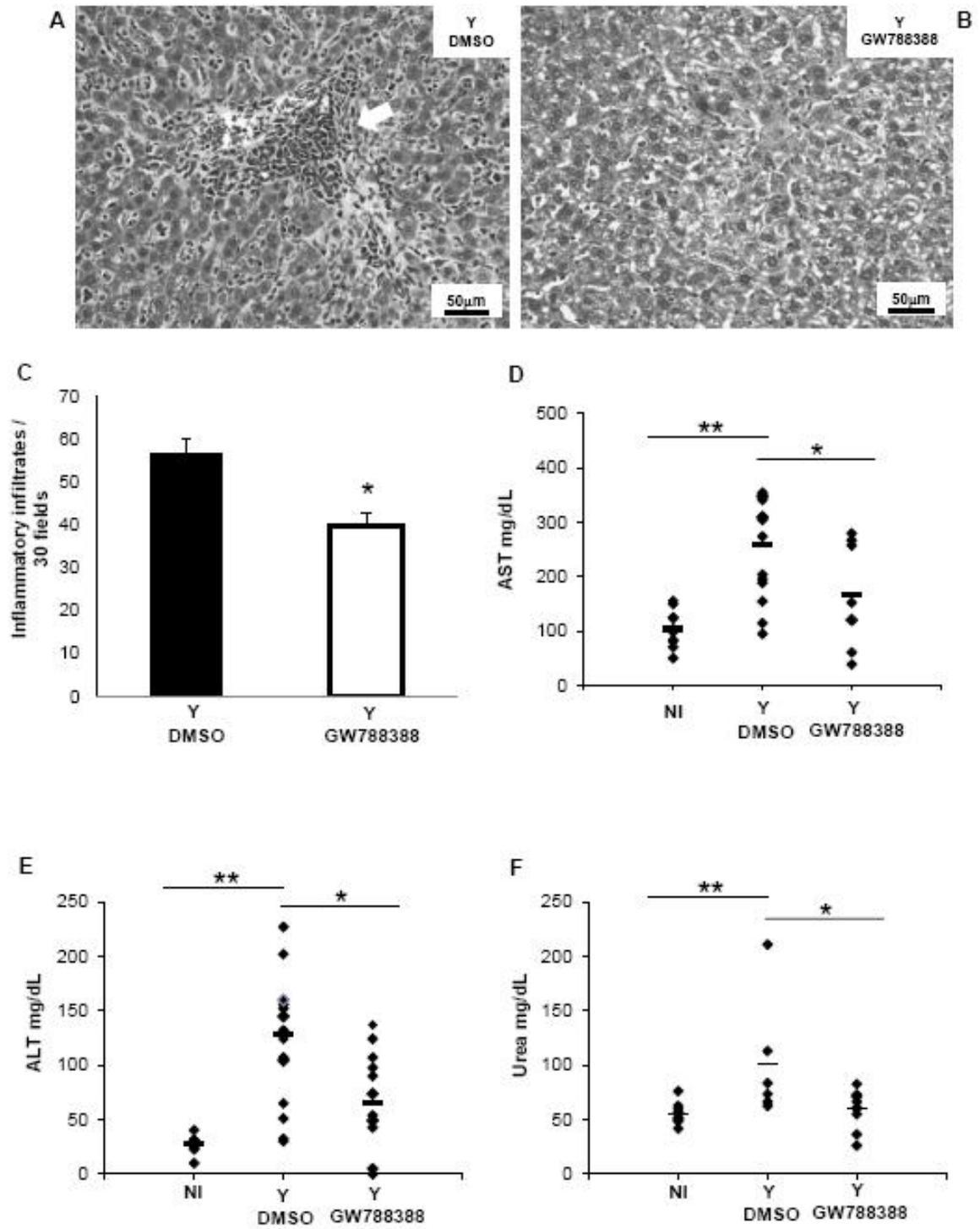


Figure 2

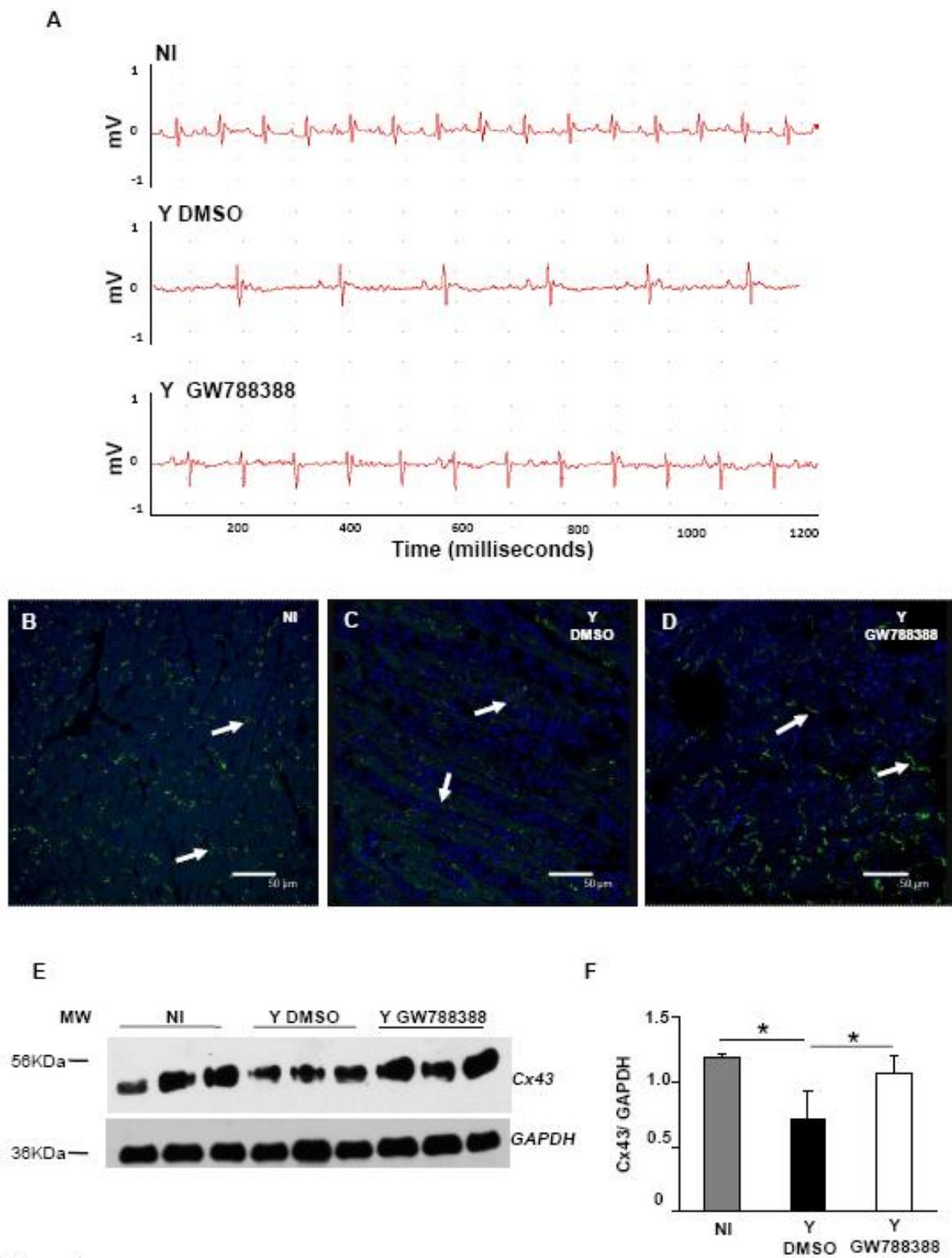


Figure 3

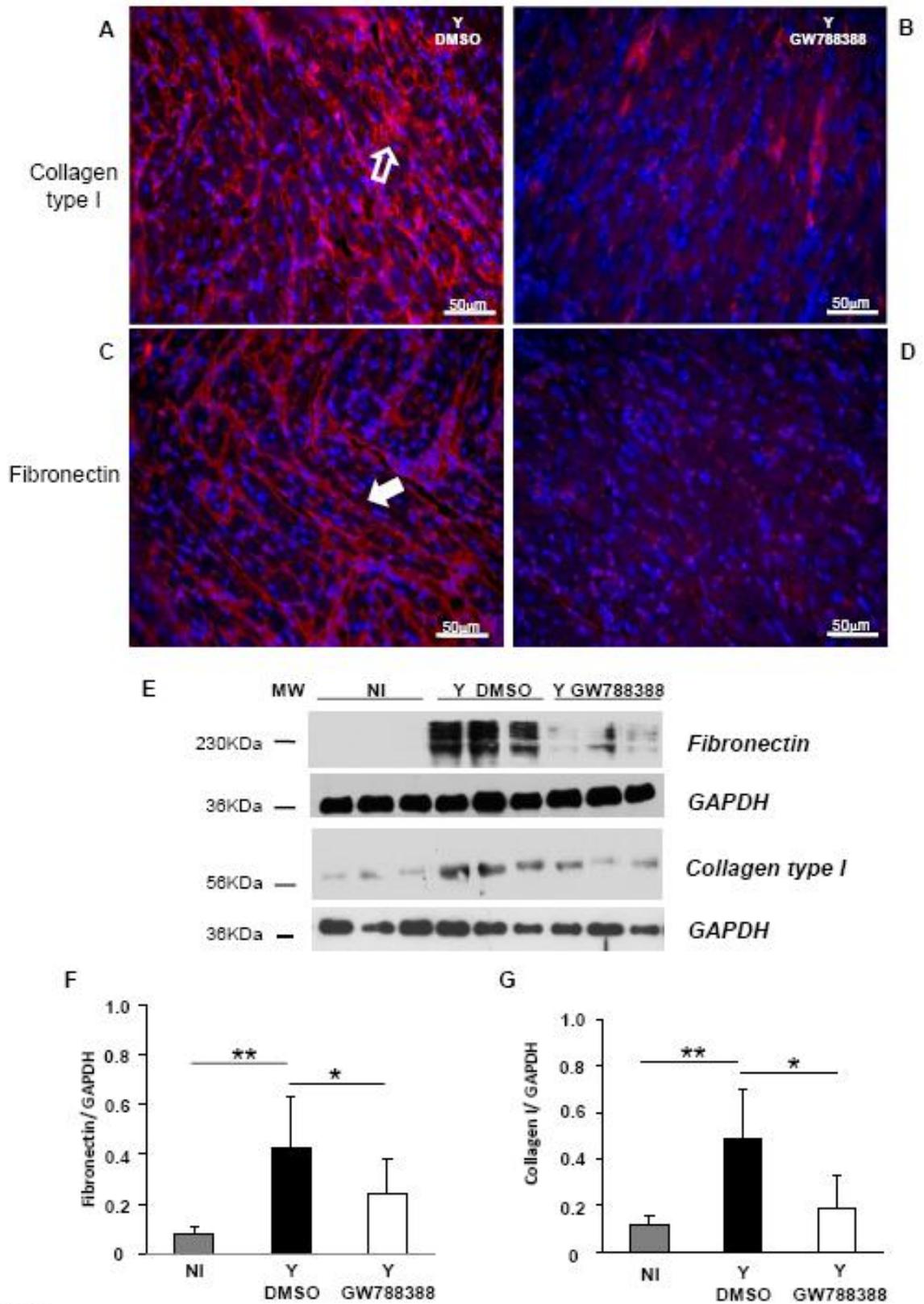


Figure 4

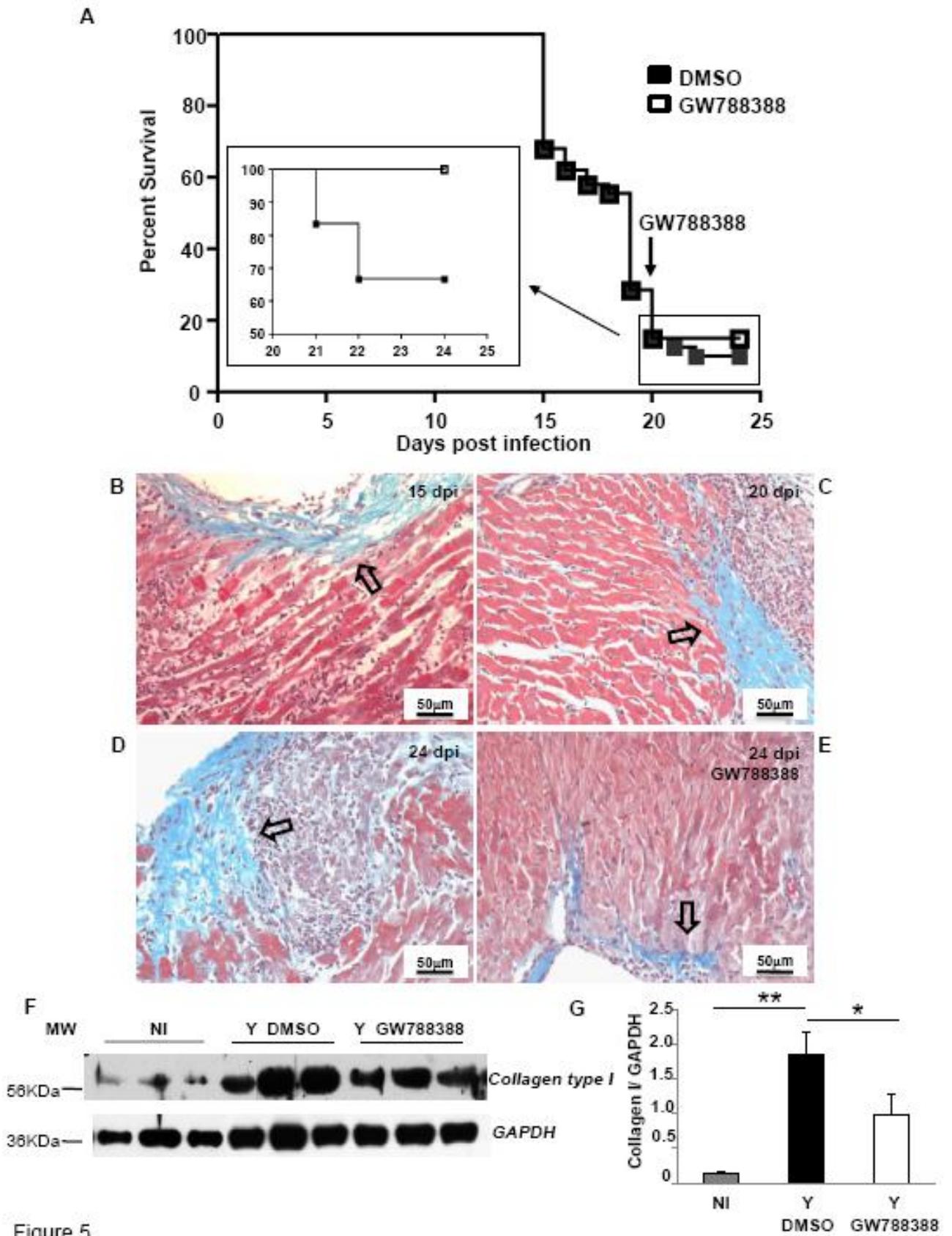


Figure 5