

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Laura Lacerda Coelho

Efeito da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e do TNF
sobre a ativação de fibroblastos cardíacos *in vitro*

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

Orientador (es): Dra. Luciana Ribeiro Garzoni
Dra. Joseli Lannes- Vieira

RIO DE JANEIRO
2015

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

C672 Coelho, Laura Lacerda

Efeito da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e do TNF sobre a ativação de fibroblastos cardíacos *in vitro* / Laura Lacerda Coelho. – Rio de Janeiro, 2015.

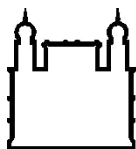
xviii, 89 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.]

Bibliografia: f. 71-89

1. Doença de Chagas. 2. Fibroblastos cardíacos. 3. Fibrose. I.
Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Laura Lacerda Coelho

Efeito da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e do TNF
sobre a ativação de fibroblastos cardíacos *in vitro*

ORIENTADOR (ES): Dra. Luciana Ribeiro Garzoni
Dra. Joseli Lannes-Vieira

Aprovada em: 29/09/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Elen Mello de Souza - Presidente e Revisora

Prof. Dr. Andrea Alice da Silva - Titular

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho - Titular

Prof. Dr. Tatiana Galvão de Melo de Oliveira - Suplente

Prof. Dr. Wagner Baetas da Cruz - Suplente

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2015

Não hesito em dedicar mais uma conquista
a você, MÃE (*in memoriam*).

Pelo seu altruísmo.
Porque sem você, nada disso seria possível.

E só é possível por que
você se fez infinito.

AGRADECIMENTOS

Agradecer faz parte do reconhecimento de que a concretização do trabalho não dependeu apenas dos seus esforços e almejos. É humilde. É sincero. É bonito. Faz parte.

A minha vida não seria a mesma sem a presença (mesmo que não física ou constante) de certas pessoas que de alguma forma – à sua maneira – contribuiu para a realização deste trabalho, concretização de mais uma etapa importante da minha vida. Portanto, agradeço a vocês:

Primeiramente, a Deus. Tenho tido meus frequentes questionamentos e minha fé se esmoreceu um pouco devido aos acontecimentos da vida, mas ainda creio na Sua existência e que um dia proporcionará o meu reencontro com minha linda mãe.

À minha mãe, Geysa Maria, por estar sempre em meu coração, aquecendo-o, acalmando-o e me dando forças pra continuar.

À minha família, em especial à minha irmã Barbara, por ser tão bondosa e carinhosa, pelas gargalhadas sinceras e únicas. Aos meus avós, Gelta e Carlos Alberto (*in memoriam*), pelo abrigo em momento extremamente oportuno. Aos meus padrinhos, Ana e Ênio, por todo apoio e confiança depositados em mim não só durante a realização deste trabalho, mas na vida como um todo.

Ao meu marido, Leonardo, por ter sido amigo, companheiro e compreensivo em todos os momentos, principalmente nas horas mais difíceis. Por ter “puxado minha orelha” e me abraçado mais forte nos instantes de descompasso meu. Pelo amadurecimento recíproco. Por todo amor, que têm me alimentado e me proporcionado uma vida colorida e feliz, melhor de se viver.

Aos amigos que fiz durante a vida, em especial à Camila e Carol. Obrigada pelas palavras de conforto e risadas espontâneas. Pelos momentos de leveza e serem flores em minha vida.

Aos amigos dos laboratórios LICV, LBI e LUC. Por todo apoio, pelas conversas, conselhos e horas descontraídas. Pelo aprendizado e por tornarem o ambiente de trabalho mais prazeroso.

À minha orientadora, Luciana Garzoni, por ter me acolhido e acreditado em mim há cinco anos. Por ter me ensinado os primeiros passos e feito ter ainda mais amor pela ciência. Pela paciência. Por ter me apresentado os fibroblastos cardíacos, pelos quais me apaixonei no primeiro segundo. Obrigada por todo aprendizado e amadurecimento profissional que tem me proporcionado.

À minha orientadora, Joseli Lannes-Vieira, por ter aceitado me orientar no mestrado junto a Luciana. Obrigada por todo ensinamento, pelas discussões científicas sempre produtivas, pelos conselhos e acolhimento. Por ter confiado em mim e acreditado no meu potencial.

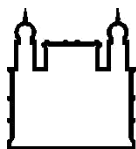
Aos membros da banca, por terem aceitado o convite de participar de um momento tão especial da minha vida. Sei que contribuirão muito e suscitarão discussões muito produtivas e prazerosas.

À Fiocruz, ao Instituto Oswaldo Cruz e à Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por terem proporcionado espaço e infraestrutura necessários para a realização desse trabalho. Pelo ensino gratuito e de qualidade.

Enfim, a todos que de alguma forma tornaram possível a concretização não apenas de mais uma etapa da minha vida acadêmica, mas de um verdadeiro sonho.

Muito obrigada!

"Não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas".
Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Efeito da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e do TNF sobre a ativação de fibroblastos cardíacos *in vitro*

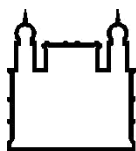
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Laura Lacerda Coelho

A fibrose cardíaca é uma importante manifestação da cardiomiopatia chagásica. O papel dos fibroblastos cardíacos (FCs) nesse processo é pouco estudado. Nesse trabalho investigamos o efeito da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e do fator de necrose tumoral (TNF) sobre a ativação de FCs *in vitro*, visando compreender o papel de FCs ativados no processo de gênese da fibrose cardíaca na infecção chagásica. Os FCs foram obtidos a partir de culturas primárias de células cardíacas de fetos de camundongos Swiss Webster, e sua ativação avaliada através da análise da proliferação, diferenciação destas células em miofibroblastos e a expressão de proteínas de matriz extracelular (ECM) através de imunofluorescência (IF) e *Western blotting* (WB). A caracterização das culturas foi feita através de análise morfológica e funcional e pela análise da expressão dos marcadores tropomiosina sarcomérica (TS) e receptor de domínio de discoidina 2 (DDR2). No nosso sistema de cultivo, 40% dos FCs foram infectados pelo *T. cruzi* quando utilizamos uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 e 24h de interação.

As análises da expressão de alfa actina de músculo liso (α -SMA) por WB, revelaram aumento desta proteína nas culturas infectadas sugerindo diferenciação para miofibroblasto nos tempos de 6h e 24h pós-infecção. As análises de proteínas de ECM revelaram aumento na expressão de fibronectina (FN) após 6h, 24h e 48h de infecção e de laminina (LN) após 6h e 24h, quando comparadas as culturas não infectadas. O tratamento com TNF não estimulou a produção de TNF e NO pelos FCs. TNF também não induziu a diferenciação e a síntese de ECM, porém influenciou o processo de proliferação destas células, revelado pelo aumento de células ki-67+ por IF. Ainda, a citocina reduziu as taxa de infecção dos FCs pelo parasita. Assim, nossos resultados demonstram um efeito da infecção pelo *T. cruzi* e do TNF sobre a ativação de fibroblastos cardíacos, seja através da indução de diferenciação celular e expressão de proteínas de ECM, ou ainda pela indução de proliferação dos FCs, processos estes que podem contribuir para a gênese da fibrose cardíaca observada na doença de Chagas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Effect of *Trypanosoma cruzi* infection and TNF on cardiac fibroblasts activation *in vitro*

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Laura Lacerda Coelho

Cardiac fibrosis is an important manifestation of Chagas cardiomyopathy. The involvement of cardiac fibroblasts (CFs) in this process is understudied. Here we investigated the effect of *Trypanosoma cruzi* infection (Y strain) and tumor necrosis factor (TNF) on CFs *in vitro*, aiming to understand the role of activated CFs in the process of genesis of cardiac fibrosis in chagasic infection. The CFs were obtained from primary cardiac cell cultures from Swiss Webster mice fetuses, and CFs activation analyzed by proliferation, myofibroblast differentiation and extracellular matrix (ECM) proteins expression, through immunofluorescence (IF) and *Western blotting* (WB). The characterization of cultures was made through morphological and functional analysis and through analysis of expression of the markers sarcomeric tropomyosin (TS) and discoidin domain receptor 2 (DDR2). In our culture system, 40% of CFs were infected by *T. cruzi* using a multiplicity of infection (MOI) of 10 e 24h of interaction. WB analysis of alpha smooth muscle actin (α -SMA) expression revealed increased expression of this protein in *T. cruzi*-infected CFs suggesting cell differentiation into myofibroblasts at 6h and 24h post infection. ECM proteins analyses revealed increased expression of fibronectin (FN) at 6h, 24h e 48h pos infection and laminin (LN) at 6h and 24h in *T. cruzi*-infected cultures compared with non-infected ones. TNF treatment did not stimulate TNF and NO production by CFs. TNF also did not induce differentiation and ECM production by CFs, but influenced the proliferation process of these cells, revealed by increase of ki-67+ cells, through IF. Furthermore, the cytokine decrease the infection rate of CFs by *T. cruzi*. Therefore, our results demonstrate an effect of *T. cruzi* infection and TNF on cardiac fibroblasts activation, either through induction of cell differentiation and expression of ECM proteins, or by induction of CFs proliferation, processes which may contribute to the genesis of cardiac fibrosis in Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1 - Distribuição de casos de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	4
Figura 1.2 – Formas de vida e ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	6
Figura 1.3 - Manifestações clínicas de fase aguda e crônica da doença de Chagas.....	8
Figura 1.4 - Manifestações clínicas características da cardiomiopatia chagásica crônica.....	9
Figura 1.5 - Fibroblastos cardíacos ativados.....	17
Figura 1.6 – Inflamação, resposta imune e fibrose.....	18

RESULTADOS

Figura 4.1- Características morfológicas de cultivos de FCs murinos.....	31
Figura 4.2 - Caracterização da expressão de tropomiosina sarcomérica na cultura de fibroblastos cardíacos em diferentes passagens.....	33
Figura 4.3 - Caracterização da expressão de tropomiosina sarcomérica na cultura de fibroblastos cardíacos através de <i>Western Blotting</i> e imunofluorescência.....	34
Figura 4.4 - Caracterização da expressão de DDR2 na cultura de fibroblastos cardíacos.....	35
Figura 4.5 - Características funcionais de cultivos de FCs murinos.....	37
Figura 4.6 - Caracterização por imunofluorescência da expressão de proteínas de matriz extracelular e alfa actina de músculo liso nas culturas de fibroblastos cardíacos.....	38
Figura 4.7- Ciclo do <i>T. cruzi</i> no fibroblasto cardíaco.....	40
Figura 4.8 - Efeito da infecção pelo <i>T. cruzi</i> sobre a diferenciação de FCs.....	42
Figura 4.9 - Efeito da infecção pelo <i>T. cruzi</i> sobre a expressão de componentes de ECM em FCs.....	44
Figura 4.10 - Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a produção de TNF pelos FCs durante infecção pelo <i>T. cruzi</i>	46
Figura 4.11 - Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a produção de NO pelos FCs durante infecção pelo <i>T. cruzi</i>	48
Figura 4.12 - Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a infecção de FCs pelo <i>T. cruzi</i>	50

Figura 4.13 - Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a diferenciação de FCs durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	52
Figura 4.14 - Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a expressão de fibronectina pelos FCs durante infecção pelo <i>T. cruzi</i>	54
Figura 4.15 - Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a expressão de laminina pelos FCs durante infecção pelo <i>T. cruzi</i>	55
Figura 4.16 - Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a proliferação de FCs durante infecção pelo <i>T. cruzi</i> avaliada através da imunofluorescência para ki-67	57

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3.1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência 26

Tabela 3.2 - Anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blotting*..... 28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
°C	Grau Celsius
Ang II	Angiotensina II
α -SMA	Alfa actina de músculo liso
β 2-AR	Receptor beta-2 adrenérgico
BRA	Bloqueadores do receptor de angiotensina
BSA	Albumina de soro bovino
BSS	Solução salina balanceada sem cálcio e magnésio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CO ₂	Dióxido de carbono
Cx43	Conexina 43
Cx45	Conexina 45
CK-MB	Isoenzima MB da creatina quinase
DAPI	1-4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DC	Doença de Chagas
DDR2	Receptor de domínio de discoidina 2
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
dpi	Dia pós-infecção
DTUs	Unidades discretas de tipagem
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FCs	Fibroblastos cardíacos
FN	Fibronectina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
g	Aceleração da gravidade
h	Hora
HSCs	Células estreladas hepáticas
IgG	Imunoglobulina G

IC	Insuficiência cardíaca
IECAs	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IF	Imunofluorescência
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1 alfa
\sim IL-1 β	Interleucina-1 beta
6 kDa	Quilodalton
LN	Laminina
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteinases de matriz extracelular
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO _x	Termo genérico para NO e NO ₂
p	Passagem
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PS2	SMAD2 fosforilada
RAAS	Sistema renina–angiotensina–aldosterona
RIPA	Ensaio de radioimunoprecipitação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfado de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletenodiamina

TGF- β	Fator transformante de crescimento beta
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 de TNF
TNFR2	Receptor 2 de TNF
Tris - HCl	Tris-hidroxi-metil-amino-metano cloridrato
TS	Tropomiosina sarcomérica
v	Volume
w	Massa
WB	<i>Western Blotting</i>
μg	Micrograma
μM	Micromolar

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
Apresentação	1
Revisão Bibliográfica	3
1.1 Doença de Chagas	3
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> : formas de vida e ciclo biológico do parasita.....	4
1.1.3 Fase aguda e fase crônica da doença de Chagas	6
1.1.4 A cardiomiopatia chagásica.....	8
1.2 Fibrose na doença de Chagas	9
1.2.1 Papel do <i>T. cruzi</i> na gênese da fibrose.....	9
1.2.2 Papel das citocinas na gênese da fibrose	11
1.3 Fibrogênese	13
1.3.1 Reparo tecidual e fibrose	13
1.3.2 Papel do fibroblasto e da inflamação na gênese da fibrose	14
1.3.3 Fibroblastos cardíacos	15
1.3.4 Citocinas e fibroblastos cardíacos.....	18
1.3.5 Papel do fibroblasto cardíaco na gênese da fibrose em cardiopatias ..	19
1.4 Reversão da fibrose: fibroblastos cardíacos como alvo terapêutico.....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22

3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Cultura primária de células cardíacas e obtenção dos fibroblastos cardíacos	23
3.2 Ensaio <i>in vitro</i> de infecção de fibroblastos cardíacos pelo <i>T. cruzi</i>, tratamento com TNF	23
A. Procedência do parasita	23
B. Infecção dos fibroblastos cardíacos	24
C. Estímulo dos fibroblastos cardíacos com TNF	24
3.3 Coloração por Giemsa	25
3.4 Imunofluorescência	25
3.5 Extração e dosagem de proteínas	27
3.6 <i>Western Blotting</i>	27
3.7 Dosagem de TNF	28
3.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)	29
3.9 Análises estatísticas	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Caracterização dos cultivos de fibroblastos cardíacos	30
4.1.1 Caracterização morfológica das células em cultura	30
4.1.2 Caracterização do enriquecimento das culturas de células cardíacas em fibroblastos através de <i>Western Blotting</i> e imunofluorescência	32
4.1.3 Características funcionais	36
4.2 Infecção <i>in vitro</i> pelo <i>T. cruzi</i> e ciclo do parasita nos FCs	39
4.3 Efeito da infecção pelo <i>T. cruzi</i> sobre a ativação de FCs	41
4.3.1 Efeito sobre a diferenciação de FCs em miofibroblastos	41
4.3.2 Efeito sobre a expressão de componentes de ECM	43
4.4 Efeito do pré-tratamento de culturas de FCs com TNF durante a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
4.4.1 Produção de TNF pelos FCs	45
4.4.2 Efeito do TNF sobre a produção de NO pelos FCs	47
4.4.3 Efeito do TNF sobre a infecção de FCs	49
4.4.4 Efeito do TNF sobre a diferenciação de FCs em miofibroblastos	51
4.4.5 Efeito do TNF sobre a expressão de componentes de ECM em FCs	53
4.4.6 Efeito do TNF sobre a proliferação de FCs	56

5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	68
7. PERSPECTIVAS	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

Apresentação

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2015). Hoje, considera-se como fator importante a globalização da DC, devido às migrações humanas em busca de melhor qualidade de vida (WHO, 2015). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), sua principal manifestação, é caracterizada por parasitismo, infiltrados inflamatórios causando miocitólise, necrose, progressiva fibrose e hipertrofia do coração (Rassi Jr *et al.*, 2010). A carga parasitária é um importante fator determinante da patologia cardíaca como demonstrado em camundongos cronicamente infectados com o *T. cruzi* e tratados com benznidazol (Garcia *et al.*, 2005). Na CCC, a inflamação e a destruição progressiva do tecido cardíaco levam a alterações funcionais que podem surgir de 10 a 30 anos após a infecção pelo *T. cruzi*. Citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (interferon-gama) e TNF (fator de necrose tumoral) desempenham papel crucial no controle do *T. cruzi* na infecção aguda, estimulando a produção de óxido nítrico (NO), importante molécula efetora com atividade microbicida (Junqueira *et al.*, 2010). Porém, concentrações plasmáticas de TNF, TGF- β (fator transformante de crescimento beta) e IFN- γ estão diretamente correlacionadas ao grau de disfunção cardíaca em pacientes portadores da doença de Chagas (Pérez *et al.*, 2011).

TNF e TGF- β apresentam importante papel na gênese da fibrose em diversos tecidos (Wynn & Ramalingan, 2012) e a inibição da via de TGF- β foi capaz de reduzir a fibrose cardíaca em camundongos durante a fase aguda da DC (de Oliveira *et al.*, 2012). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a administração de anti-TNF a camundongos cronicamente infectados reduz as concentrações séricas de TNF e IFN- γ e reverte o quadro de fibrose cardíaca, colocando TNF (e talvez IFN- γ) como citocina chave no processo de manutenção da fibrose cardíaca na infecção crônica pelo *T. cruzi* (Pereira *et al.*, 2014a).

De modo importante, o aumento do intervalo QRS, uma das principais alterações elétricas da DC, foi diretamente correlacionado à presença de fibrose cardíaca e ao pior prognóstico dos portadores crônicos da DC (Strauss *et al.*, 2011).

Fibroblastos são os maiores constituintes da fibrose no coração que está associada com hipertrofia e insuficiência cardíaca em diferentes cardiopatias. O principal processo na gênese da fibrose cardíaca é a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos que passam a expressar alfa actina de músculo liso (α -SMA) e a secretar grandes quantidades de moléculas de componentes da matriz extracelular (ECM), que desempenham papel central no remodelamento de tecidos conectivos e cicatrização (Asazuma-Nakamura *et al.*, 2009). A ativação de fibroblastos ocorre principalmente em resposta a citocinas fibrogênicas, principalmente TGF- β e TNF (Wynn & Ramalingam, 2012), que apresentam-se em altas concentrações séricas em pacientes com a forma grave da CCC (Pérez *et al.*, 2011). Foi demonstrado que estas citocinas participam da gênese da fibrose cardíaca em outras patologias através da ativação de miofibroblastos e de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) (Liew *et al.*, 2013).

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a infecção pelo *T. cruzi* induz fibrose *in vitro* em cultivos tridimensionais de células cardíacas, independente da presença de células inflamatórias (Garzoni *et al.*, 2008). Além disso, dados recentes do nosso grupo vêm demonstrando que o tratamento com compostos com atividade tripanossomicida (posaconazol) (Nisimura LM – dados não publicados) e que modulam a via de TGF- β (SB -431542) (Ferrão PM – dados não publicados), reduzem a fibrose induzida pelo *T. cruzi* nas culturas tridimensionais de células cardíacas.

Apesar do reconhecido envolvimento de fibroblastos na gênese da fibrose em diversos tecidos em diferentes doenças (Wick *et al.*, 2013), o envolvimento dos fibroblastos cardíacos (FCs) no desenvolvimento da fibrose durante a doença de Chagas é ainda pouco estudado, o que nos motivou a investigar o papel do parasita e da citocina inflamatória TNF sobre a ativação dessas células, na tentativa de contribuir para a compreensão de processos envolvidos na gênese da fibrose cardíaca observada na DC.

1.1 Doença de Chagas

Abordaremos nesse item aspectos gerais sobre a epidemiologia, o agente etiológico da DC e suas fases clínicas, dando ênfase a CCC como principal manifestação.

1.1.1 Epidemiologia

A DC continua sendo um grande problema de saúde pública nas áreas endêmicas da América Latina, mesmo após mais de cem anos de sua descoberta por Carlos Chagas em 1909. O pesquisador não somente descreveu a doença, mas também seu agente etiológico, os vetores e reservatórios (Coura & Borges-Pereira, 2010). Trata-se de uma zoonose causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A principal forma de transmissão é pela via vetorial, por insetos triatomíneos, conhecidos comumente no Brasil como “barbeiros”. Porém, a transmissão pode ocorrer através de outros mecanismos, como: transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, transmissão oral, através de ingestão de alimentos ou líquidos contaminados e, mais raramente, acidentes laboratoriais (Rassi Jr *et al.*, 2012).

Atualmente, a DC afeta cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina, com estimativa de 12 mil mortes ao ano (WHO, 2015). Contudo, hoje se considera como fator importante a globalização da doença, devido às migrações humanas em busca de melhor qualidade de vida. Têm sido crescentemente encontrados indivíduos afetados nos Estados Unidos da América, Canadá, em muitos países da Europa e em alguns países do Pacífico Ocidental (Rassi Jr *et al.*, 2010) (Figura 1.1).

Nos últimos anos, a transmissão da DC tem sido reduzida, devido principalmente, a uma série de iniciativas coordenadas pela Organização Pan Americana de Saúde (Sánchez-Sancho *et al.*, 2010). Tais iniciativas têm encontrado sucesso principalmente nos programas de controle vetorial. Entretanto, é evidente a necessidade da adoção de novas estratégias para o controle da doença, visto o grande impacto que a mesma ainda exerce na morbidade e mortalidade de indivíduos vulneráveis (Lannes- Vieira *et al.*, 2010). Na última década, por exemplo, o número de casos reportados dobrou, e provavelmente seria ainda maior devido à

existência de casos subnotificados, tanto em áreas endêmicas quanto em regiões não endêmicas (Andrade *et al.*, 2014). As discussões têm sido pautadas em estratégias que visem: melhora no diagnóstico e tratamento, busca de novos biomarcadores prognósticos, maior cuidado e atenção médica com o paciente, entre outras medidas (Lannes- Vieira *et al.*, 2010).

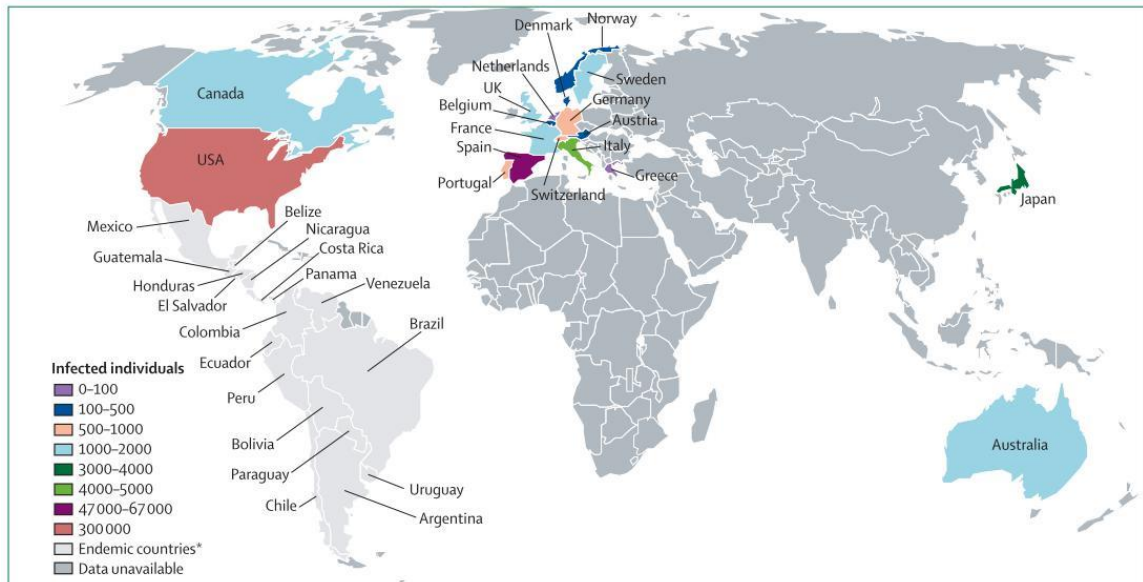


Figura 1.1: Distribuição de casos de infecção pelo *T. cruzi*. Fonte: Rassi Jr *et al.*, 2010.

1.1.2 *Trypanosoma cruzi*: formas de vida e ciclo biológico do parasita

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da DC, é um parasita hemoflagelado pertencente à Família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*. O *T. cruzi* apresenta quatro formas de vida durante seu ciclo biológico: epimastigotas, tripomastigotas sanguíneas e metacíclicas e amastigotas (Chagas 1909; Nagajyothi *et al.*, 2012). As formas epimastigotas possuem formato fusiforme e apresentam o cinetoplasto em forma de disco côncavo, localizado anteriormente ao núcleo. São encontradas na porção anterior do trato digestivo do inseto vetor, onde se replicam por fissão binária; tais formas são não infectantes. Já as tripomastigotas são alongadas e levemente achatadas, possuem cinetoplasto arredondado, localizado posteriormente ao núcleo e são formas não replicativas, mas altamente infectantes, podendo ser encontradas nos mamíferos (formas sanguíneas) e no inseto – as metacíclicas (De Souza, 2002; Teixeira *et al.*, 2011; Rassi Jr *et al.*, 2012). As amastigotas são formas intracelulares arredondadas replicativas encontradas no

hospedeiro vertebrado, possuem cinetoplasto em forma de barra e anterior ao núcleo. Ainda é reportado formas de transição intermediárias (Tyler & Engman, 2001; Teixeira *et al.*, 2011). É importante ressaltar, que as amastigotas também são capazes de infectar as células através de um mecanismo actina- dependente, mantendo o ciclo intracelular do parasita (Fernandes & Andrews, 2012).

O ciclo do *T. cruzi* é bem complexo, envolvendo hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo humanos) e invertebrados (insetos pertencentes à família Reduviidae) (Fernandes & Andrews, 2012). Teixeira *et al.*, 2011 conseguiram ilustrar de forma bem detalhada e didática o ciclo do parasita (Figura 1.2).

Na figura 1.2 podemos observar que o triatomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo (1), ingere formas tripomastigotas sanguíneas (2) que na parte anterior do tubo digestivo do animal se diferenciam em epimastigotas e algumas esferomastigotas (formas intermediárias) (3). No intestino, as formas epimastigotas se multiplicam por fissão binária (4) e ao alcançarem a porção final do tubo digestivo, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (5), que são eliminadas nas fezes ou urina do inseto, próximo ao local da picada (6). A forma metacíclica infectante (7) invade o hospedeiro quando o mesmo coça o local da picada ou pelo contato com mucosas. Dentro do hospedeiro, o parasita alcança a corrente sanguínea e penetra em células como macrófagos (8), células epiteliais, musculares e neurônios. No interior do vacúolo parasitóforo, a forma tripomastigota se diferencia em amastigota (9), ocorrendo lise do vacúolo (10) e posterior replicação intracelular do parasita por fissão binária (11). As amastigotas então iniciam o processo de diferenciação em tripomastigotas, passando por um estágio intermediário (12) ainda no interior das células. Após diferenciação para tripomastigotas, ocorre lise celular (13), liberando os parasitas na circulação (14). Pode haver lise antes que se complete o processo de diferenciação, por isso é comum haver liberação tanto de formas tripomastigotas (15a) quanto amastigotas (15b) no meio externo, ambas infectivas (Fernandes & Andrews, 2012). O ciclo continua quando triatomíneos realizam o repasto sanguíneo e ingerem as formas sanguíneas infectantes.

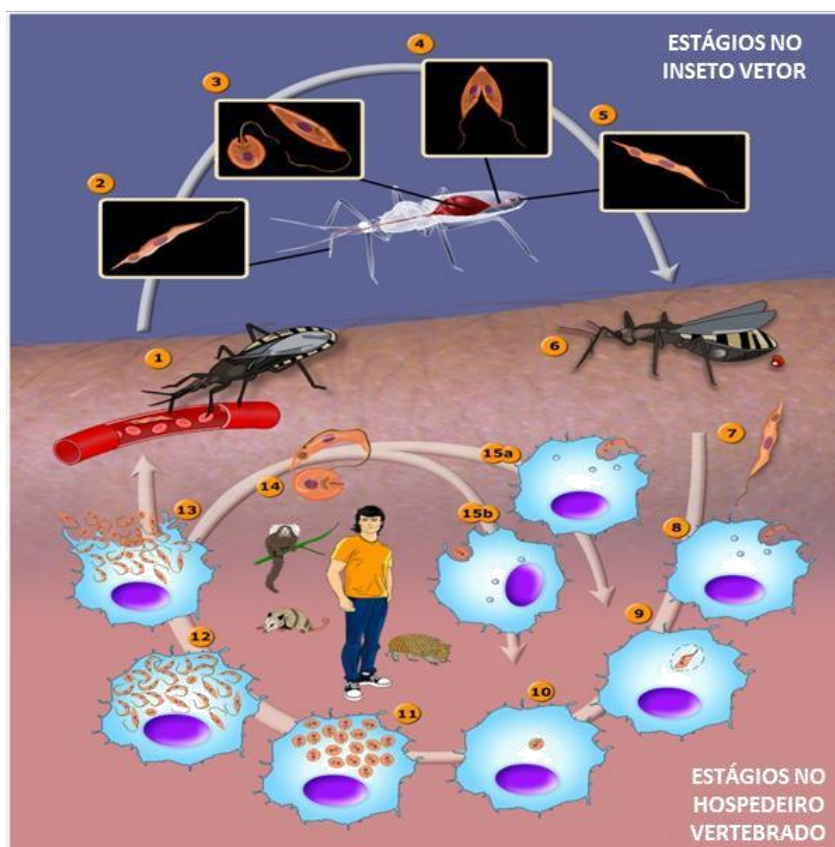


Figura 1.2: Formas de vida e ciclo biológico do *T. cruzi*.

Fonte: modificado a partir de Teixeira *et al.*, 2011.

1.1.3 Fase aguda e fase crônica da doença de Chagas

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda (ou fase inicial) é geralmente assintomática, mas pode haver casos sintomáticos, sendo as principais manifestações clínicas os sinais característicos de porta de entrada do parasita (chagoma de inoculação e sinal de Romaña), febre, dores musculares, sudorese, mal-estar, adenopatia localizada ou generalizada, hepatoesplenomegalia, insuficiência cardíaca devido à miocardite e, raramente, meningoencefalite, principalmente em crianças com menos de dois anos (Coura & Borges-Pereira, 2010; Rassi Jr *et al.*, 2012; Sánchez-Sancho *et al.*, 2010). Outras características da fase aguda incluem a alta parasitemia, além de intenso parasitismo e resposta imune exacerbada principalmente no miocárdio (Fernandes & Andrews, 2012; Vianna, 1911) (Figura 1.3).

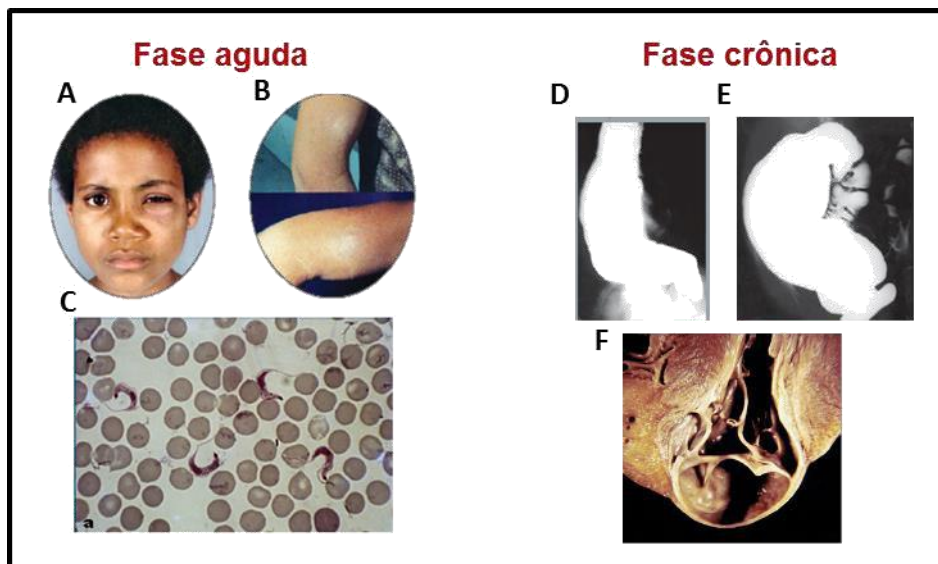


Figura 1.3: Manifestações clínicas de fase aguda e crônica da doença de Chagas. A. sinal de Romaña. B. chagoma de inoculação. C. tripomastigotas circulantes. D. megaesôfago. E. megacólon. F. dilatação e espessamento da parede ventricular esquerda, com aneurisma apical. Fontes: Kinoshita-Yanaga *et al.*, 2009; Coura & Borges-Pereira, 2010 e Rassi Jr *et al.*, 2010.

As manifestações de fase aguda se resolvem espontaneamente entre 2 a 3 meses em pelo menos 90% dos indivíduos infectados, mesmo sem tratamento tripanossomicida (Rassi Jr *et al.*, 2012). Após esse período, se sucede a fase crônica da doença que pode apresentar-se de diversas formas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardio-digestiva. Nesta fase da DC, a maioria dos pacientes não manifestam sintomas clínicos, possuem exames radiológicos do coração, esôfago e cólon normais, como também os ecocardiográficos. Contudo, apresentam sorologia positiva e/ou exames parasitológicos positivos para o *T. cruzi*, caracterizando a forma indeterminada da DC (Coura, 2007; Rassi Jr *et al.*, 2010). De 30 a 40% dos indivíduos afetados evoluem para a fase crônica sintomática, após 10 a 30 anos da fase aguda, apresentando manifestações clínicas cardíacas, digestivas ou ainda cárdio-digestivas ou mesmo neuro-cognitivas (Parker & Sethi, 2011; Silva *et al.*, 2010). Vale ressaltar que pode haver reagudização e/ou reativação da doença nos casos de pacientes crônicos com imunossupressão (Coura, 2007), sendo a parasitemia a característica mais marcante do processo de reagudização (Andrade *et al.*, 2014).

O tratamento dos portadores da infecção pelo *T. cruzi* é feito com compostos tripanossomicidas, o nifurtimox e o benznidazol, os quais têm eficácia na fase aguda da DC e fases iniciais da fase crônica (Sánchez-Sancho *et al.*, 2010; Parker & Sethi, 2011). Devido à limitada eficácia desses quimioterápicos na fase crônica e o

frequente surgimento de efeitos colaterais, outros compostos têm sido testados, como o anti-fúngico inibidor da síntese de ergosterol E1224 (ravuconazol). Atualmente esses estudos encontram-se em fase 2 de triagem clínica para o tratamento específico da fase crônica da DC (Diniz *et al.*, 2013; Urbina, 2015). De modo importante, recentemente saiu o resultado do estudo “Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis” (BENEFIT), iniciado em 2004, através do qual avaliou-se a evolução clínica de pacientes com CCC tratados com benznidazol. O estudo demonstrou que a droga tripanossomicida reduziu a detecção do parasita no soro dos pacientes, contudo não reduziu a progressão clínica cardíaca (Morillo *et al.*, 2015), enfatizando a importância da busca por tratamentos mais eficazes. Vale ressaltar que, pacientes que apresentam doença cardíaca ou digestiva, associadas com infecção pelo *T. cruzi*, devem procurar médicos especialistas na área em busca de um tratamento mais direcionado (Rassi Jr *et al.*, 2012).

1.1.4 A cardiomiopatia chagásica

A forma cardíaca da DC é a manifestação clínica mais importante, devido a sua frequência e gravidade (Rassi Jr *et al.*, 2012). Segundo a “Drugs for Neglected Diseases initiative” (DNDi) de 2010, a DC é uma das principais causas de cardiomiopatia infecciosa em todo o mundo. As principais manifestações clínicas são alterações no sistema de condução elétrica, arritmias, problemas tromboembólicos, aneurismas, insuficiência cardíaca (IC) e morte súbita (Fernando *et al.*, 2014; Coura & Borges-Pereira, 2010). A IC é uma manifestação tardia da CCC, causando altas taxas de mortalidade quando comparada com a IC de outras etiologias (Rassi Jr *et al.*, 2012). Outras características da patogênese da CCC incluem: parasitismo, infiltrados inflamatórios causando miocitólise, necrose, fibrose progressiva e hipertrofia do coração (Rassi Jr *et al.*, 2010) (Figura 1.4). Vale ressaltar que segundo a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica, a CCC pode ser classificada em 4 estágios (A, B, C e D) de acordo com o grau de acometimento do tecido cardíaco, conforme recomendações internacionais adaptadas à etiologia chagásica (Hunt *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2011), sendo esta classificação importante para a avaliação do prognóstico da doença e tratamento do paciente. No estágio A estão os pacientes que apresentam eletrocardiograma (ECG) e R-X de tórax normais, e não possuem IC. No estágio B,

encontram-se os pacientes com alterações no ECG e R-X de tórax, mas que nunca tiveram sinais ou sintomas de IC. No C, estão os pacientes com disfunção do ventrículo esquerdo e sintomas de IC prévios ou atuais. No estágio D, encontram-se aqueles com sintomas graves de IC em repouso, sendo refratários ao tratamento clínico e, portanto, necessitando de intervenções especializadas (Andrade *et al.*, 2011).

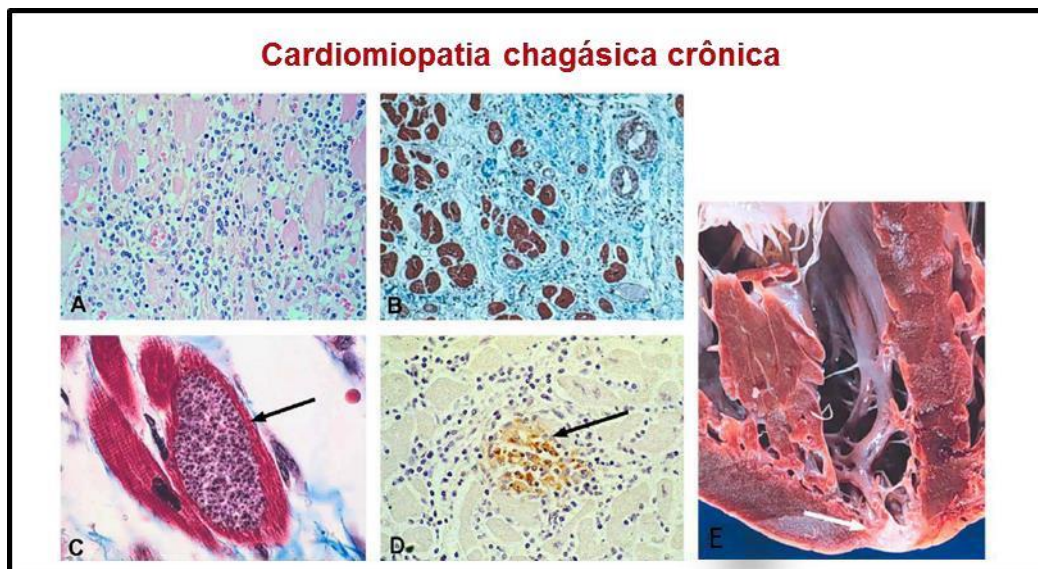


Figura 1.4: Manifestações clínicas características da cardiomiopatia chagásica crônica. A. intensa miocardite. **B.** fibrose focal e disseminada no tecido cardíaco. **C.** pseudocistos do *T. cruzi*. (seta). **D.** granuloma contendo antígenos do *T. cruzi* (seta). **E.** ventrículo esquerdo hipertrófico e dilatado, apresentando fibrose no vértice (seta). Fonte: Higuchi *et al.*, 2013.

1.2 Fibrose na doença de Chagas

1.2.1 Papel do *T. cruzi* na gênese da fibrose

Como vimos, a fibrose cardíaca é uma importante manifestação clínica da CCC (Rassi Jr *et al.*, 2012). Por muito tempo o papel do *T. cruzi* na patogenia da CCC foi alvo de questionamentos, e teorias tendo em pauta a questão da autoimunidade favorecendo o desenvolvimento das lesões chagásicas e consequente fibrose foram suscitadas (Borda *et al.*, 1984; Kierszenbaum, 1985). Isso se deve, principalmente, ao fato de que na fase crônica da DC, apesar de haver persistência do parasita no tecido cardíaco, há uma menor carga parasitária, e é raro encontrar correlação entre presença de ninhos de amastigotas e infiltrados

inflamatórios em biópsias de pacientes, utilizando-se as tradicionais técnicas histopatológicas (Higuchi *et al.*, 2003). Contudo, nos últimos anos foram introduzidos novos métodos de estudo e diagnóstico, como o PCR e a imunistoquímica, possibilitando a detecção do kDNA e antígenos do parasita no tecido cardíaco (Ben Younès-Chennoufi *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1993). Desta maneira, foi possível observar co-localização de alta frequência de antígenos ou material genômico do *T. cruzi* com infiltrados inflamatórios bem como com regiões com miocitólise e fibrose (Andrade & Grimaud, 1986; Andrade *et al.*, 1989; Marin-Neto *et al.*, 2007).

Dados do nosso grupo demonstraram que a infecção pelo *T. cruzi* induz fibrose em modelo de cultivo tridimensional (3D) de células cardíacas, independente da presença de células inflamatórias (Garzoni *et al.*, 2008). Além disso, estudos demonstraram que o *T. cruzi* é capaz de induzir diretamente a produção de TGF- β em células cardíacas *in vitro* (Waghabi *et al.*, 2009), podendo dessa forma contribuir para a fibrose no tecido cardíaco, visto que TGF- β é uma das principais citocinas envolvidas na indução da fibrose (Kisseleva & Brenner, 2008).

A relação direta entre persistência do parasita e patogenia na DC é ainda suportada através de estudos utilizando-se compostos tripanossomicidas. Reversão da fibrose em modelo murino de infecção crônica pelo *T. cruzi* foi verificada tratando-se os camundongos com benznidazol (Andrade *et al.*, 1991). Além disso, dados recentes do nosso grupo vêm demonstrando que o tratamento com o agente tripanossomicida posaconazol reduz fibrose em cultivo 3D de células cardíacas infectadas (Nisimura LM – dados não publicados). Vale ressaltar que, segundo Silva e colaboradores (2006), o posacanazol também pode melhorar a funcionalidade cardíaca através da recuperação do citoesqueleto de cardiomiócitos que o mesmo promove em células infectadas pelo parasita. De modo interessante, o antiarrítmico amiodarona, frequentemente utilizado no tratamento de pacientes cardiopatas na DC (Andrade *et al.*, 2011), com potencial efeito anti-*T. cruzi*, também demonstrou exercer influência na recuperação do citoesqueleto de células cardíacas, bem como na distribuição de conexina 43 (Cx43), e na melhora da contratilidade celular, durante infecção *in vitro* pelo *T. cruzi* (Adesse *et al.*, 2011).

Apesar da autoimunidade ainda ser questionada por alguns autores, todos esses achados apontam para a atuação direta do parasita como fator desencadeador das lesões cardíacas e conseqüente geração de fibrose na DC. Contudo, muitos trabalhos demonstram o aumento na deposição de componentes

de ECM no tecido cardíaco associado não somente com a presença de ninhos de amastigotas do *T. cruzi*, mas também com infiltrados inflamatórios. Nesse sentido, atualmente é consenso a participação do parasita conjuntamente com a inflamação e possivelmente, outros mecanismos do sistema imunológico na patogênese da CCC (Andrade & Grimaud, 1986; Andrade *et al.*, 1989; Higuchi *et al.*, 2003; Marin-Neto *et al.*, 2007), possivelmente contribuindo para a geração de fibrose, uma das suas principais manifestações clínicas (Rassi Jr *et al.*, 2012).

1.2.2 Papel das citocinas na gênese da fibrose

Dentre os principais mediadores inflamatórios orquestrados na DC, merecem destaque as citocinas. A infecção aguda pelo *T. cruzi* é acompanhada por uma excessiva ativação do sistema imunológico, havendo grande estimulação de produção de citocinas inflamatórias, como o IFN- γ e o TNF que desempenham papel crucial no controle do parasita, ao estimular os macrófagos a produzirem NO, importante molécula efetora com atividade microbicida (Muñoz-Fernández *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1995). Contudo, apesar da inflamação exacerbada ser favorável ao controle da infecção, também provoca dano tecidual, devido principalmente ao infiltrado inflamatório que se estabelece nos tecidos do hospedeiro. De maneira importante, a inflamação tem sido reportada contribuir para o desenvolvimento da CCC (Marin-Neto *et al.*, 2007; Junqueira *et al.*, 2010). Já em 1987, Higuchi e colaboradores haviam relatado maior prevalência de miocardite em biópsias endomiocárdicas de pacientes com alterações cardíacas graves.

Mais do que favorecer a patogenia da DC, a inflamação tem sido relatada contribuir para a gênese da fibrose observada na CCC. Andrade e colaboradores (1986) estudaram a constituição dos infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, e, segundo os autores, há predomínio de células do sistema imune, como macrófagos, além de outros tipos celulares, como os fibroblastos e miofibroblastos e também grande deposição de colágeno, sugerindo associação entre o processo inflamatório e a fibrogênese. Vale acrescentar, que através de imunoistoquímica, foi observado em tecidos cardíacos provenientes de autópsias de pacientes com CCC, presença não somente de macrófagos, mas de linfócitos T, principalmente TCD8⁺, nos infiltrados inflamatórios (Reis *et al.*, 1993). De fato, aumento na expressão de genes associados à

inflamação e a ECM tem sido relatado, seja em estudos avaliando estágios iniciais de infecção ou fase crônica da DC (Garg *et al.*, 2003; Mukherjee, *et al.*, 2003).

Importante ressaltar, que o envolvimento das citocinas no desenvolvimento da cardiomiopatia na DC, incluindo gênese de fibrose já tem sido bastante reportado, em diferentes modelos experimentais (Araújo-Jorge *et al.*, 2002; Waghbi *et al.*, 2007; de Oliveira *et al.*, 2012; Ferrão – dados não publicados). Esses trabalhos buscam o entendimento do papel do TNF, TGF- β , IFN- γ , além de outro mediador inflamatório, o NO, os quais se apresentam em altas concentrações séricas em pacientes com a forma grave da CCC (Pérez *et al.*, 2011), e suas vias de sinalização no processo de patogênese da doença. Estudos revelaram elevadas concentrações de TGF- β circulante, juntamente com aumento na expressão de fibronectina e SMAD2 fosforilada (PS2), um marcador de ativação da via de sinalização de TGF- β , em biópsias de pacientes crônicos com cardiomiopatia (Araújo-Jorge *et al.*, 2002). De maneira interessante, a administração oral de um inibidor da via de sinalização do TGF- β (GW788388) diminuiu o número de ninhos de amastigotas, infiltrados inflamatórios e deposição de proteínas de ECM em modelo experimental *in vivo* de infecção aguda pelo *T. cruzi* (de Oliveira *et al.*, 2012). Ainda, estudos *in vitro* utilizando um composto que modula o receptor I do TGF- β (SB-431542), revelaram que o mesmo além de interferir na infecção e ciclo do parasita (Waghbi *et al.*, 2007), reduz a fibrose induzida pelo *T. cruzi* em modelo tridimensional de cultivo de células cardíacas (Ferrão PM – dados não publicados).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o anticorpo anti-TNF infliximab reduz a expressão do RNA mensageiro de TNF no tecido cardíaco, as concentrações séricas de TNF e IFN- γ em camundongos cronicamente infectados e reverte o quadro de fibrose cardíaca, colocando TNF (e talvez IFN- γ) como citocina chave no processo de manutenção da fibrose cardíaca na infecção crônica pelo *T. cruzi* (Pereira *et al.*, 2014a). Utilizando o imunomodulador pentoxifilina, que age diminuindo a expressão e a produção dos receptores do TNF (Mahmoud *et al.*, 2012), em modelo experimental murino de infecção crônica, foi possível impedir a progressão do dano cardíaco, diminuindo a deposição de fibronectina no tecido e regulando a expressão de Cx43, além de reverter alterações eletrocardiográficas (Pereira *et al.*, 2015). Dados sugerem que a via de sinalização TNF/TNFR1 (receptor 1 do TNF) está envolvida no desenvolvimento da cardiomiopatia durante a infecção pelo *T. cruzi* (Kroll-Palhares *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2015). Utilizando modelo de infecção aguda, camundongos geneticamente deficientes em TNFR1 apresentaram

expressão normal de Cx43 no coração, e os tratados com anti-TNF mostraram diminuição na deposição de fibronectina, além de níveis reduzidos da atividade de CK-MB no soro, um marcador de lesão cardíaca (Kroll-Palhares *et al.*, 2008).

Não se sabe ainda ao certo o papel do NO na gênese da fibrose na DC, contudo sabe-se que concentrações aumentadas dessa biomolécula, seja no soro de pacientes ou no de animais cronicamente infectados estão correlacionadas com a gravidade da CCC, inclusive associado às concentrações séricas elevadas de TNF (Pérez-Fuentes *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014b). Vale ressaltar, que uma vez que os FCs são ativados pelas citocinas abordadas anteriormente e inclusive por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Porter & Turner, 2009; Wynn & Ramalingam, 2012; Bai *et al.*, 2013), esse talvez possa ser um dos processos envolvidos na indução de fibrose na DC.

Resumindo, vimos que há dados na literatura que suportam que tanto o parasita quanto a inflamação têm papel fundamental na gênese da DC. Apesar de ainda ser um grande desafio entender todos os processos e mecanismos envolvidos na patogenia da doença, esses estudos abriram portas para além de novos conhecimentos, novas oportunidades de se avaliar e desenhar estratégias terapêuticas para o tratamento da DC, visando melhor prognóstico e qualidade de vida do paciente.

1.3 Fibrogênese

A fibrose cardíaca é uma importante manifestação clínica da CCC (Rassi Jr *et al.*, 2012). Nesse sentido, nesse tópico abordaremos um pouco mais sobre as características fisiopatológicas e como é possivelmente orquestrado esse processo em outras patologias que não a DC.

1.3.1 Reparo tecidual e fibrose

Os componentes acelulares que compõem os diferentes tecidos do organismo são denominados coletivamente como matriz extracelular (ECM), os quais incluem: os colágenos; proteoglicanos; glicoproteínas como a fibronectina e a laminina; além de proteases, citocinas e fatores de crescimento (Corda *et al.*, 2000; Porter & Turner, 2009).

A ECM forma uma rede tridimensional organizada envolvendo e conectando os componentes celulares dos tecidos, tendo papel importante na arquitetura e função tecidual (Porter & Turner, 2009).

Durante o desenvolvimento dos tecidos ocorre um processo de remodelamento tecidual fisiológico, caracterizado por mudança na sua geometria, permitindo que os mesmos se adaptem às mudanças mecânicas, químicas e elétricas do ambiente. Normalmente, o remodelamento envolve mudanças na quantidade e organização dos componentes da ECM, importante para manter a homeostase do tecido (Baudino *et al.*, 2006).

Fibrose é definida como uma excessiva deposição de colágeno e outros componentes de ECM em órgãos e tecidos como consequência da proliferação e ativação de fibroblastos e miofibroblastos (Wick *et al.*, 2013). Ela pode ser desencadeada por diferentes fatores, como: infecções, toxinas, drogas, dano tecidual e inflamação recorrente (Winn & Ramalingam, 2013). Embora a fibrogênese seja essencial para o reparo tecidual normal e cicatrização de feridas (Baudino *et al.*, 2006), o processo pode se tornar progressivo e irreversível, levando a deposição exacerbada de componentes de ECM, culminando em mal funcionalidade do tecido/órgão e morte (Winn & Ramalingam, 2013). O processo fibrótico já foi descrito ocorrer em diferentes órgãos, sendo os principais: coração, pulmão, fígado, rim e pele (Hinz *et al.*, 2007).

1.3.2 Papel do fibroblasto e da inflamação na gênese da fibrose

Fibroblastos são comumente encontrados nos tecidos conjuntivos que compõem os órgãos (Vasquez *et al.*, 2011). Já é bem conhecida a participação de fibroblastos/miofibroblastos na gênese da fibrose em outras patologias que não a DC, como fibrose hepática, pulmonar e renal, formação de queloide, doenças autoimunes entre outras, tendo a inflamação um papel importante como fator desencadeador da fibrogênese (Wick *et al.*, 2013). Além disso, tem sido reportado o papel de fibroblastos na progressão do câncer, havendo a participação de células inflamatórias e citocinas nesse processo (Bhowmick *et al.*, 2004), como veremos a adiante.

Na cirrose hepática alcoólica, por exemplo, após dano tóxico e inflamação, ocorre necrose e apoptose das células do fígado as quais são continuamente

substituídas por tecido fibrótico produzido não somente pelos miofibroblastos, mas também pelas células estreladas hepáticas (HSCs). Primeiramente, ocorre deposição de colágeno tipo III, e nesse momento a fibrose ainda é reversível; contudo, aos poucos ocorre substituição pelo colágeno tipo I, favorecendo o estabelecimento de um estágio cirrótico considerado irreversível (Miller *et al.*, 2011; Wick *et al.*, 2013).

A esclerose sistêmica é uma doença autoimune inflamatória-fibrótica. A deposição de grandes quantidades de componentes de ECM na pele e órgãos viscerais é uma das mais notáveis manifestações clínicas. Estudos vêm demonstrando que células da vasculatura, como células endoteliais e pericitos têm papel importante no processo fibrótico, servindo como fonte de miofibroblastos. (Chizzolini *et al.*, 2011; Rajkumar *et al.*, 2005; Li & Jimenez, 2011).

Fibroblastos também contribuem para a gênese da excessiva cicatriz presente nas queloides. Nessa patologia, há aumento da proliferação de fibroblastos e desregulação na produção de componentes de ECM (MMPs, TIMPs (inibidores teciduais das metaloproteinases), colágeno e outras proteínas da ECM) por essas células, e a inflamação novamente contribuindo para tais eventos (Wick *et al.*, 2013).

No câncer em desenvolvimento, células do estroma, como os fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias são recrutadas para o local da tumorigênese, tornando-se ativadas e alterando o padrão de secreção de citocinas, fatores de crescimento e componentes da ECM, criando o chamado “estroma reativo”.

Alteração na produção/secreção de ECM promove a progressão do câncer, através da indução de proliferação celular e aumento da capacidade invasiva das células neoplásicas, devido à, principalmente, degradação da membrana basal (Marjanovic *et al.*, 2013).

1.3.3 Fibroblastos cardíacos

Os FCs são células majoritárias no coração. Apesar de os cardiomiócitos contribuírem mais em massa para o volume do coração, FCs apresentam-se em maior quantidade (Baudino *et al.*, 2006). Segundo Jugdutt (2003), um coração humano adulto normal apresenta 30% de cardiomiócitos e 70% de não-miócitos, sendo a maioria fibroblastos cardíacos. Em ratos adultos esta proporção se mantém (Baudino *et al.*, 2006), mas varia no modelo murino adulto, onde foi verificado que a

população celular do coração era composta por 56% de cardiomiócitos e 44% de não-miócitos, sendo 27% dos não-miócitos, s fibroblastos cardíacos (Baneerjee *et al.*, 2007). Estes são tradicionalmente definidos como células de origem mesenquimal que produzem colágeno intersticial (Kanekar *et al.*, 1998), contudo a questão da origem é controversa e dependendo da atividade biológica da célula, esta poderá produzir colágeno ou não (Baudino *et al.*, 2006). Estudos têm discutido diferentes fontes de origem para os fibroblastos cardíacos, levando em consideração o aumento na densidade dessas células correlacionado à fibrose do miocárdio durante seu desenvolvimento ou fibrose patológica (Bing *et al.*, 1997; Sedmera *et al.*, 2000), e não necessariamente aumento da proliferação local (Benjamin *et al.*, 1989). Nesse sentido, os FCs podem ser células residentes do tecido cardíaco, ou ainda: originados através da transição epitélio-mesenquimal, transição endotélio-mesenquimal, provenientes de células tronco mesenquimais da medula óssea, ou oriundos de pericitos (Border & Noble, 1994; Sundberg *et al.*, 1996; Sartore *et al.*, 2001; Takeda & Manabe, 2011).

Fibroblastos apresentam heterogeneidade fenotípica, dependendo do estágio de desenvolvimento, órgão e condições fisiológicas (Fries *et al.*, 1994). De forma geral, possuem formato fusiforme achatado (Porter & Turner, 2009), núcleo oval, extensivo retículo endoplasmático rugoso, um complexo de Golgi proeminente e material citoplasmático granular abundante (Baudino *et al.*, 2006). Vale ressaltar que tais células não possuem microfilamentos contráteis (Tomasek *et al.*, 2002).

FCs expressam vimentina, e secretam componentes de ECM, como fibronectina e laminina (Eghbali, 1992). Também, FCs estão envolvidos na manutenção da estrutura do tecido cardíaco, incluindo homeostase da ECM, através da produção de metaloproteinases e seus inibidores teciduais, os TIMPs e produção de fatores de crescimento, citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como NO, importantes em eventos de sinalização (Porter & Turner, 2009; Vasquez *et al.*, 2011).

Marcadores específicos para estas células ainda não foram encontrados; contudo, recentemente, foi demonstrado que o receptor de domínio de discoidina 2 (DDR2) é expresso em FCs, mas não em células endoteliais, células do músculo liso e cardiomiócitos (Goldsmith *et al.* 2004).

Uma vez ativados, principalmente em respostas às citocinas e fatores de crescimento como o TGF- β e o TNF (Wynn & Ramalingam, 2012), os fibroblastos cardíacos quiescentes passam a expressar α -SMA, uma proteína de citoesqueleto, a

exibir um fenótipo contrátil e a secretar grandes quantidades de componentes da ECM; tais células, agora denominadas miofibroblastos, desempenham um papel central no remodelamento de tecidos conectivos e cicatrização (Asazuma-Nakamura *et al.*, 2009). Além dos parâmetros descritos acima, os FCs exibem maior propriedade proliferativa, migratória e secretória, alterando principalmente, o perfil de secreção de citocinas e fatores de crescimento como as interleucinas (IL-6 e IL-1), TGF- β e TNF (Porter & Turner, 2009) (Figura 1.5).

Embora essas alterações funcionais tenham um papel reparador inicial, podem se tornar prejudiciais em resposta a estímulos prolongados ou intensos, levando à grande deposição de ECM, fibrose e, conseqüente, alterações elétricas e, mais tardiamente, à disfunção cardíaca (Gurtner *et al.*, 2008).

Miofibroblastos não estão presentes no tecido cardíaco normal com a exceção das válvulas cardíacas. Apesar de miofibroblastos de pele sofrerem apoptose após conclusão do reparo tecidual (Desmouliere *et al.*, 1995), falha no processo de apoptose de FCs tem sido sugerida contribuir para a progressão da fibrose (Brown & Dejana, 2003).



Figura 1.5: Fibroblastos cardíacos ativados. Fibroblastos cardíacos respondem a estímulos ambientais de diversas maneiras: através da diferenciação em miofibroblastos; alterando seu perfil migratório, proliferativo e secretório; modificando a secreção de componentes da ECM, inclusive metaloproteinases e TIMPs. Fonte: Adaptado a partir de Porter & Turner, 2009.

1.3.4 Citocinas e fibroblastos cardíacos

Segundo Wick e colaboradores (2013), independente da forma de fibrose (cardíaca, pulmonar, etc), reações inflamatórias/ imunológicas são desencadeadoras do processo fibrótico, havendo participação tanto de elementos da imunidade inata, quanto adaptativa. De acordo com palavras dos próprios autores do artigo, “sem inflamação, sem fibrose”. Wynn & Ramalingan (2012) destacam a participação de mediadores inflamatórios e imunológicos, como as citocinas, quimiocinas e radicais livres, no processo de ativação e diferenciação de fibroblastos (Figura 1.6).

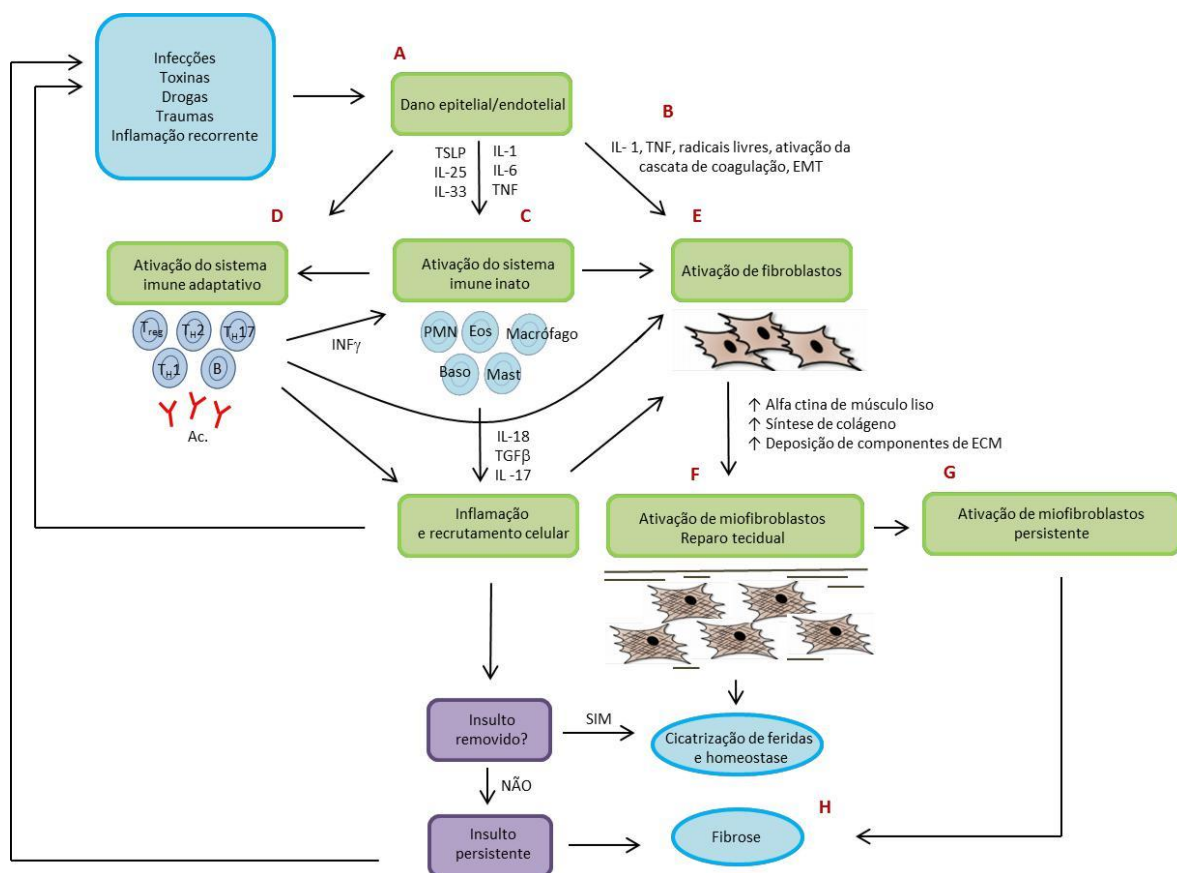


Figura 1.6. Inflamação, resposta imune e fibrose. Dano epitelial/endotelial causado por diferentes insultos leva a ativação do sistema imunológico e inflamação como mecanismo para restabelecer a homeostase (A). Primeiramente há ativação da via de coagulação (B), seguida por uma inflamação aguda e ativação do sistema imune inato (C). As citocinas liberadas pelas células epiteliais e do sistema imune inato (ex.: macrófagos, neutrófilos) estimulam a ativação do sistema imune adaptativo, que pode ser diretamente ativado pelo dano tecidual (D). Mediadores inflamatórios e imunológicos (citocinas, quimiocinas e radicais livres) ativam fibroblastos e estimulam sua diferenciação em miofibroblastos (E), que através da síntese de componentes de ECM e angiogênese tentam conter o dano (F). Falha no processo de remoção/contenção do insulto pode exacerbar a resposta inflamatória e ativação de fibroblastos (G), levando a um dano e reparo tecidual contínuo e intenso, resultando em fibrose (H). TSLP, linfopoietina estromal tímica; Ac, anticorpo; PMN, Leucócitos polimorfonucleares; EOS, eosinófilos; Baso, basófilos; Mast, mastócitos. Fonte: Modificado a partir de Wynn & Ramalingan, 2012.

Fibroblastos cardíacos são fontes primárias de TGF- β no coração (Bujak & Frangogiannis, 2007). TGF- β tem sido reportado contribuir para a migração de FCs, além de induzir produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanos (Border & Nobre, 1994, Brown *et al.*, 2007). Esta citocina também é capaz de induzir a expressão de α -SMA nessas células, sendo um importante ativador da diferenciação de FCs em miofibroblastos (Tomasek *et al.*, 2002).

FCs são as principais fontes de TNF no miocárdio (Yokoyama *et al.*, 1999; Shames *et al.*, 2002; Porter & Turner, 2009), agindo de forma autócrina via os receptores de TNF do tipo I e II (TNFR1 e TNFR2) (Porter *et al.*, 2004). TNF modula a função dos fibroblastos cardíacos de maneira bem ampla, que inclui indução de aumento na migração/invasão, proliferação, expressão de proteínas da ECM, MMPs e citocinas pró-inflamatórias (Porter *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2007). Também age indiretamente, influenciando no sistema RAAS, através da indução da expressão de receptores para Ang II nos FCs (Gurantz *et al.*, 2005; Cowling *et al.*, 2005).

IL-1 β estimula migração de FCs e secreção de MMPs, contudo inibe a proliferação celular e síntese de colágeno (Siwik *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008). Também age influenciando no sistema RAAS, através da indução da expressão de receptores para Ang II nos FCs (Gurantz *et al.*, 2005; Cowling *et al.*, 2005). Já a citocina IL-6 induz proliferação de fibroblastos cardíacos e tem sido revelado estimular a degradação da matriz através da diminuição da síntese de colágeno e aumento da expressão de MMPs (Siwik *et al.*, 2000).

Além disso, estudos recentes têm demonstrado que as citocinas TNF, TGF- β , IL-1 β e IL-6 estimulam a produção de ROS no tecido cardíaco, bem como são estimuladas pelos mesmos (Nian *et al.*, 2004). Evidências sugerem que ROS podem servir como moléculas sinalizadoras, ativando ERK1/2 e a produção de TGF- β contribuindo assim para a proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Thannickal & Fanburg, 2000).

1.3.5 Papel do fibroblasto cardíaco na gênese da fibrose em cardiopatias

Podemos perceber que há o reconhecido envolvimento de fibroblastos na gênese da fibrose em diferentes doenças e tecidos (Wick *et al.*, 2013). Da mesma forma, tem sido elucidado o papel dos FCs no desenvolvimento da fibrose em outras cardiopatias que não a DC. Segundo Asazuma-Nakamura e colaboradores (2009),

os FCs são os maiores constituintes da fibrose cardíaca associada à hipertrofia em doenças cardiovasculares, principalmente no infarto do miocárdio, hipertensão e IC (Porter & Turner, 2009; Vasquez *et al.*, 2011; Lindner *et al.*, 2014).

A fibrose cardíaca é caracterizada por acúmulo desproporcional de colágeno e outras proteínas da ECM, que ocorre após uma série de eventos, incluindo morte dos cardiomiócitos, inflamação, aumento da sobrecarga de pressão e hipertrofia (Bishop & Lindahl, 1999), o que pode levar a alterações elétricas, perda de função cardíaca e morte.

Foi reportado que em condições de hipóxia, como no infarto do miocárdio, há ativação de miofibroblastos, que são estimulados pela morte das células cardíacas a produzirem ECM (Li *et al.*, 1999). Além disso, mudanças no estiramento mecânico cardíaco foram descritas exercer efeito pró-fibrótico sobre os fibroblastos (Yamada *et al.*, 2005).

Em pacientes com IC é comum haver aumento nos níveis miocárdicos e circulantes de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) (Swynghedauw, 1999). Estudos têm revelado papel importante da noradrenalina na estimulação da proliferação de fibroblastos cardíacos, via ativação de seu receptor de superfície celular β 2-AR (Turner *et al.*, 2003).

Endotelina-1 também se encontra em altas concentrações em pacientes com IC, exercendo seu efeito na gênese da fibrose cardíaca através da ativação de FCs induzindo sua proliferação, síntese de colágeno e inibição de collagenases (Guarda *et al.*, 1993; Piacentini *et al.*, 2000; Kuruvilla *et al.*, 2007).

De forma interessante, trabalhos têm demonstrado que a angiotensina II (Ang II), molécula que se encontra ativada em pacientes com infarto do miocárdio, hipertensão e IC (Ma *et al.*, 2010), também é importante ativadora da diferenciação de FCs em miofibroblastos, e sua ação se dá através da estimulação da produção de ROS (Bai *et al.*, 2013), ou ainda induzindo a síntese de TGF- β (Campbel & Katwa, 1997), TNF (Sato *et al.*, 2003), e outras moléculas bioativas, por essas células.

1.4 Reversão da fibrose: fibroblastos cardíacos como alvo terapêutico

Dada a relevância do papel do fibroblasto cardíaco na fibrogênese, alguns estudos têm demonstrado que agentes terapêuticos prescritos para as mais diversas

doenças cardiovasculares podem ter seu efeito benéfico ao modular a função destas células. E, mais que isso, ainda sugerem que FCs são um potencial alvo terapêutico para atenuar a fibrose cardíaca.

Os anti-hipertensivos, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs) e os bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA), já são descritos reduzir o remodelamento cardiovascular (Rosenkranz, 2004; Anavekar & Solomon, 2005). Estudos *in vivo* (Yu *et al.*, 2001) demonstraram que tais inibidores diminuem o número de miofibroblastos cardíacos no coração após infarto do miocárdio. Ademais, lisinopril, um agente inibidor da ECA, foi capaz de inibir a síntese de colágeno induzida por TGF- β , em fibroblastos cardíacos de rato adulto (Lijnen *et al.*, 2004).

Beta-bloqueadores, prescritos para o tratamento da hipertensão, arritmia e IC (Swedberg *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2005), principalmente os não seletivos ou β 2-seletivos (subtipo predominantemente expresso pelos FCs), inibem a proliferação de FCs induzida ou não por catecolaminas (Yin *et al.*, 2003; Lotze *et al.*, 2002).

O hormônio relaxina, secretado na circulação em grandes quantidades durante a gravidez, têm sido reconhecido por apresentar papel cardioprotetor modulando os efeitos da Ang II em pacientes com IC (Dschietzig *et al.*, 2001). Nesse sentido, Samuel e colaboradores (2004), verificou que a relaxina modula a proliferação induzida por Ang II, além da diferenciação e produção de colágeno estimuladas por Ang II e TGF- β em FCs *in vitro*.

Estudos têm mostrado que estatinas, utilizadas para o tratamento da hipercolesterolemia, possuem efeito benéfico anti-remodelamento em cardiopatias (Tsouli *et al.*, 2008). Sinvastatina atenua a expressão de α -SMA induzida por TGF- β , em fibroblastos atriais caninos (Shiroshita-Takeshita *et al.*, 2007) e a proliferação de FCs humanos induzida por TNF (Porter *et al.*, 2004).

Ainda, de forma interessante, estudos sugerem que a metformina, antidiabético mundialmente utilizado, possui papéis cardioprotetores adicionais (Sasaki *et al.*, 2009), sendo um desses efeitos o de promover a inibição da fibrose cardíaca (Xiao *et al.*, 2010). De fato, um trabalho recente demonstrou atenuação da fibrose cardíaca em modelos de ratos não diabéticos com IC pós-infarto do miocárdio (Yin *et al.*, 2011). Um estudo ainda mais atual sugere que a inibição da fibrose cardíaca pela metformina pode ser devido a sua capacidade de inibir a diferenciação de FCs em miofibroblastos, processo este induzido por Ang II (Bai *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito da infecção pelo *T. cruzi* e do TNF sobre a ativação de fibroblastos cardíacos *in vitro*, visando compreender o papel de FCs ativados no processo de gênese da fibrose cardíaca na infecção chagásica.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Obter e caracterizar cultivos de fibroblastos cardíacos murinos;
- 2) Estabelecer a infecção pelo *T. cruzi* em fibroblastos cardíacos *in vitro*;
- 3) Verificar a ativação de fibroblastos cardíacos durante a interação com o *T. cruzi* através da análise da expressão de α -SMA, proteínas de ECM (laminina e fibronectina) e proliferação celular (ki-67);
- 4) Avaliar o papel do TNF e da infecção pelo *T. cruzi* sobre a produção de TNF e NO pelos fibroblastos cardíacos;
- 5) Avaliar o efeito do TNF sobre a infecção de fibroblastos cardíacos pelo *T. cruzi*;
- 6) Investigar o efeito do tratamento com TNF sobre a ativação de fibroblastos cardíacos não infectados e infectados pelo *T. cruzi* através da análise da expressão de α -SMA, proteínas de ECM (laminina e fibronectina) e proliferação celular (ki-67).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura primária de células cardíacas e obtenção dos fibroblastos cardíacos

Fêmeas grávidas (18-21 dias de gestação) de camundongos Swiss Webster foram eutanaziadas em câmara de CO₂, foi feita a excisão do coração dos fetos e remoção do ventrículo para posterior fragmentação e digestão enzimática com tripsina (0,05%) e colagenase (0,01%) em tampão fosfato-salino (PBS), como descrito previamente (Meirelles *et al.*, 1986). Para obtenção dos fibroblastos cardíacos (FCs), realizamos dois protocolos inicialmente: utilizando células aderidas na primeira hora e células aderidas com 24h. Após as células obterem confluência, foram feitos os repiques utilizando-se tripsina (0,125%) e EDTA (0,02%) em solução salina balanceada sem cálcio e magnésio (BSS – CMF), pH: 7,8. As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultivo (sem gelatina) a 37°C em atmosfera contendo CO₂ a 5%, em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo penicilina e estreptomicina, suplementado com 2% de L-glutamina, 8% de CaCl₂, 2% de extrato embrionário de pinto e de 10% de soro fetal bovino (SFB). Nesse trabalho, utilizamos fibroblastos cardíacos a partir da segunda passagem (p.02), uma vez que obtivemos enriquecimento de FCs a partir da primeira passagem (expressão negativa para tropomiosina sarcomérica). Para os experimentos, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro na densidade de 5 x 10⁴ células/ poço, ou em placas de Petri (60 mm) na densidade de 5 x 10⁵ células/ placa (sem gelatina). Após 24h de cultivo houve troca do meio nutritivo.

Parte dos cultivos primários foram obtidos no Laboratório de Ultraestrutura Celular (LUC) – Fiocruz/IOC, em colaboração.

3.2 Ensaio *in vitro* de infecção de fibroblastos cardíacos pelo *T. cruzi*, tratamento com TNF

A. Procedência do parasita

Formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, cepa caracterizada como sendo *T. cruzi* II (TcII) em relação às unidades discretas de tipagem (DTUs) (Zingales *et al.*, 2009, 2012), foram obtidas a partir do sangue de camundongos

Swiss Webster (Meirelles *et al.*, 1984). Vinte camundongos machos (18 a 20 gramas) foram inoculados com 3×10^5 formas tripomastigotas, pela via intraperitoneal e no 7º dia pós-infecção (dpi), pico da parasitemia, foi realizado o isolamento e purificação dos parasitas. Os camundongos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ e o sangue foi obtido por punção cardíaca, utilizando-se 0,2 mL do anticoagulante citrato de sódio a 3,8%. Para obtenção do plasma sanguíneo enriquecido em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o sangue total foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 rpm (200 g), para obtenção do plasma sanguíneo que posteriormente foi centrifugado por 15 minutos a 3.500 rpm (2500 g) para sedimentação dos parasitas. Com a finalidade de remover as plaquetas, o sedimento contendo os parasitas e plaquetas foi ressuspensão em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e mantido por 20 minutos em banho-maria a 37 °C. Ao final dessa etapa, o grumo de plaquetas foi removido e os parasitas foram centrifugados novamente por 15 minutos a 3.500 rpm (2500 g). O sedimento contendo os parasitas foi então ressuspensão em 2mL de DMEM e o número de parasitas/mL determinado pela quantificação em câmara de Neubauer, utilizando-se microscopia óptica de contraste de fase (Zeiss). Todos os procedimentos com animais experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais experimentais (CEUA) Fiocruz sob licença LW-37/13.

B. Infecção dos fibroblastos cardíacos

Após 24 horas de cultivo, os fibroblastos cardíacos (a partir da passagem 2) foram infectados utilizando-se MOI de 10. Vinte e quatro horas pós – infecção, os cultivos foram lavados com PBS para remoção dos parasitas não interiorizados. As análises experimentais foram feitas em diferentes tempos de infecção: 6h, 24h, 48h, 72h e 96h, de acordo com a pergunta experimental e conforme indicado nas figuras. Cultivos não infectados foram utilizados como controle.

C. Estímulo dos fibroblastos cardíacos com TNF

A citocina TNF murina recombinante (BMS301, Ebioscience) foi adicionada em diferentes concentrações (0,1 ng/ mL; 3 ng/ mL; 30 ng/ mL) ao cultivo de fibroblastos cardíacos 2 horas antes da infecção e seu estímulo foi mantido durante

24h, tempo em que foram feitas as análises experimentais. Cultivos não infectados e infectados, ambos não tratados, foram utilizados como controles.

3.3 Coloração por Giemsa

As células foram lavadas 3x com PBS e depois fixadas em Bouin (75 mL de solução de ácido pícrico a 1,2%, 25 mL de formalina (37% formaldeído) e 5 mL de ácido acético) durante 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas 3x com etanol 70% para retirada do fixador e houve posterior coloração com solução de Giemsa (1:10) em água destilada, a temperatura ambiente. Após cerca de 50 minutos no corante, as células fixadas foram lavadas 2x com água tridestilada e desidratadas em ordem crescente/decrescente de xilol-acetona. As lamínulas foram montadas em Permount. As células foram visualizadas através de microscopia de campo claro (Nikon Eclipse E200, Japão) e fotografadas com auxílio do programa Nis-Elements BR, versão 4.0. Foram contados 10 campos aleatórios por lamínula, que corresponde a aproximadamente 300 células totais, utilizando-se a objetiva de 20x.

3.4 Imunofluorescência

As células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavadas 3x com PBS e permeabilizadas com PBS + Triton x-100 0,5%. Foi feito o bloqueio com 4% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS e incubação com anticorpos primários (especificados na Tabela 3.1) em 4% de PBS+BSA, durante 16 a 20h, a 4°C. Após bloqueio com 1% de BSA em PBS, as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a Alexa 488/594 (Tabela 3.1) por 1 hora (37°C) diluídos em 1% de PBS+BSA. Os controles negativos foram preparados na presença apenas do anticorpo secundário, estando ausentes anticorpos primários específicos para as proteínas do estudo. As lâminas foram montadas com *ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI* (P36931, Molecular Probes – Life Technologies) para posterior visualização, utilizando-se um sistema de imagem composto por microscópio Nikon Eclipse Ci (Nikon, Japão) acoplado ao sistema de fluorescência formado pelos aparelhos Intensilight C-HGFI e Digital Sight DS-U3 (Nikon, Japão). Foram fotografadas utilizando - se o programa Nis-Elements

BR, versão 4.0. Foram contados 10 campos aleatórios por lamínula, que corresponde a aproximadamente 300 células totais, utilizando-se a objetiva de 20x.

Tabela 3.1: anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência.

Anticorpos	Fabricante/código	Diluição
Anticorpo primário IgG de camundongo anti-tropomiosina sarcomérica	Sigma – T9283	1:80
Anticorpo primário IgG de camundongo anti- α -SMA	Sigma – A2547	1:400
Anticorpo primário IgG de coelho anti-FN	Sigma – F3648	1:400
Anticorpo primário IgG de coelho anti-LN	Sigma - L9393	1:50
Anticorpo primário IgG de coelho anti-Ki67	ABCAM - ab16667	1:200
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa Fluor® 594	Molecular Probes - A21203	1:800
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa Fluor® 488	Molecular Probes - A21202	1:800
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 594	Molecular Probes - A21207	1:800
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 488	Molecular Probes - A21206	1:800

3.5 Extração e dosagem de proteínas

Para o preparo das amostras, foi feita a extração de proteínas dos fibroblastos cardíacos com tampão de lise RIPA (50 mM Tris -HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 1% desoxicolato de sódio), acrescido de 10% de inibidores de protease (13136600, Roche) e 10% de fosfatase (P0044, Sigma) seguido por sonicação (2 ciclos de 10 segundos), utilizando o equipamento da empresa Fisher Scientific (FB120, Pittsburgh, EUA)

A dosagem de proteínas foi feita através de espectrofotometria, utilizando-se o kit BCA (Pierce – Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. A absorbância do total de proteínas nas amostras foi comparada com a curva padrão de BSA 1mg/mL. Os lisados foram mantidos a -80°C até o momento do experimento.

3.6 Western Blotting

Entre 10 a 20 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra 5x (Tris-HCl 80 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 12%; β mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,05%), submetidas à ação da temperatura de 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Sackking Gel: 5% Bis/Acrilamida; 0,19 M Tris (pH 8,8); 0,2% SDS; 0,1% Persulfato de amônio e 0,1% TEMED - Running Gel: 10% ou 12 % Bis/Acrilamida; 0,37 M Tris (pH6, 8); 0,2% SDS; 0,1% Persulfato de amônia e 0,04% TEMED). Sobre o gel, foi aplicado um campo elétrico de 100 Volts, separando as proteínas de acordo com seu peso molecular.

Após eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose para realização do *imunoblot*. Visando inibir as ligações inespecíficas dos anticorpos com proteínas, foi feito bloqueio com solução contendo TBST (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) e 5% de leite em pó desnatado (MOLICO®) por 1 hora. Os anticorpos primários (especificados na Tabela 3.2) diluídos em solução de bloqueio (TBST + 5% de leite) foram incubados durante 16 a 20h a 4°C. Os anticorpos secundários (Tabela 3.2) foram incubados por uma hora a temperatura ambiente e também diluídos em solução de bloqueio. O anticorpo IgG camundongo anti GAPDH (Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase) foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente, sendo utilizado como controle interno. A revelação da

peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit Super Signal West Pico (Pierce Biotechnology) e filmes de Raios-X. A densitometria foi realizada utilizando-se o *software* ImageJ, versão 1.47 (NIH, EUA). Os valores obtidos foram normalizados com relação aos valores dos controles não infectados.

Tabela 3.2: anticorpos utilizados nos ensaios de *Western Blotting*.

Anticorpos	Fabricante e código do produto	Diluição
Anticorpo primário IgG de camundongo anti-tropomiosina sarcomérica	Sigma – T9283	1:1.000
Anticorpo primário IgG de camundongo anti- α -SMA	Sigma – A2547	1:5.000
Anticorpo primário IgG de coelho anti FN	Sigma – F3648	1:5.000
Anticorpo primário IgG de coelho anti-LN	Sigma - L9393	1:1.000
Anticorpo primário IgG de camundongo anti-GAPDH	Fitzgerald - 10R-G109a	1:60.000
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase	Thermo Scientific - 31430	1:10.000
Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase	Thermo Scientific - 31460	1:10.000

3.7 Dosagem de TNF

A avaliação da produção de TNF pelos FCs foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando-se os sobrenadantes dessas células em diferentes situações de cultivo. Com esse propósito, o kit de ELISA para detecção de TNF de camundongo foi obtido da BioLegend (cat. 430905, EUA), e foi utilizado conforme o protocolo do fabricante. A reação colorimétrica obtida pela revelação da

reação foi avaliada na absorvância de 450 nm em um leitor de microplacas (Expert Plus, Alemanha). As concentrações das amostras foram calculadas com base em uma curva-padrão de 7,8 pg/mL a 500 pg/mL.

3.8 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A análise da produção de NO pelos FCs foi indiretamente avaliada, pelo método de Griess, através do qual é possível dosar a acumulação de nitrito, o produto da degradação oxidativa do NO (Green *et al.*, 1981). Nesse sentido, os sobrenadantes de cultivos de FCs, macrófagos murinos (linhagem RAW 264.7) não estimulados (utilizados como controles negativo) e estimulados com INF- γ + LPS (lipopolissacarídeo) (controles positivos) foram coletados e misturados com igual volume de reagente de Griess, consistindo de uma mistura 1:1 de 2% (w/v) de solução de sulfanilamida e 5% (w/v) de solução de naftiletilenodiamina dihidrocloridrato com 0,1% (v/v) de HCl em H₂O destilada. A acumulação de nitrito foi determinada pela medida da absorvância a 540 nm em um leitor de placas (Expert Plus, Alemanha). As concentrações das amostras foram calculadas com base em uma curva-padrão de 100 μ M a 3,125 μ M.

3.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 5.0 (Graph-Pad Software Inc.). A análise estatística foi feita aplicando-se o teste *t-Student* ou ANOVA, considerando diferença significativa quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (***)

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos cultivos de fibroblastos cardíacos

4.1.1 Caracterização morfológica das células em cultura

Uma vez que os FCs foram obtidos a partir do cultivo primário de células cardíacas, compostas por cardiomiócitos, FCs e uma pequena quantidade de células endoteliais, foi necessário caracterizarmos as culturas para verificarmos em qual passagem tínhamos nossa cultura enriquecida em FCs. Realizamos dois protocolos inicialmente: utilizando células aderidas na primeira hora e células aderidas com 24h. Verificamos que o primeiro protocolo resultou em um número muito baixo de células aderidas (dado não mostrado) e optamos por utilizar as células com 24h de adesão. As células foram analisadas desde o cultivo primário até a passagem 3, através de microscopia de contraste de fase ou coloração com Giemsa (figura 4.1 A). No cultivo primário, mesmo não utilizando a gelatina como substrato, após 72h de cultivo, verificamos através de microscopia de contraste de fase a presença de alguns grupos de cardiomiócitos contráteis com uma confluenta monocamada de FCs espalhados em seu entorno (figura 4.1 B). Observamos raros grupos de células endoteliais (dado não mostrado). Nas passagens subsequentes não observamos mais células contráteis e nem grupos de células endoteliais e observamos grande quantidade de FCs caracterizados por células espalhadas e formando monocamada confluenta (figura 4.1 C, D, E). Através da coloração com Giemsa os FCs apresentavam-se como células grandes com formato fusiforme, citoplasma emitindo prolongamentos, núcleo oval e grande com nucléolos evidentes (figura 4.1 F e G).

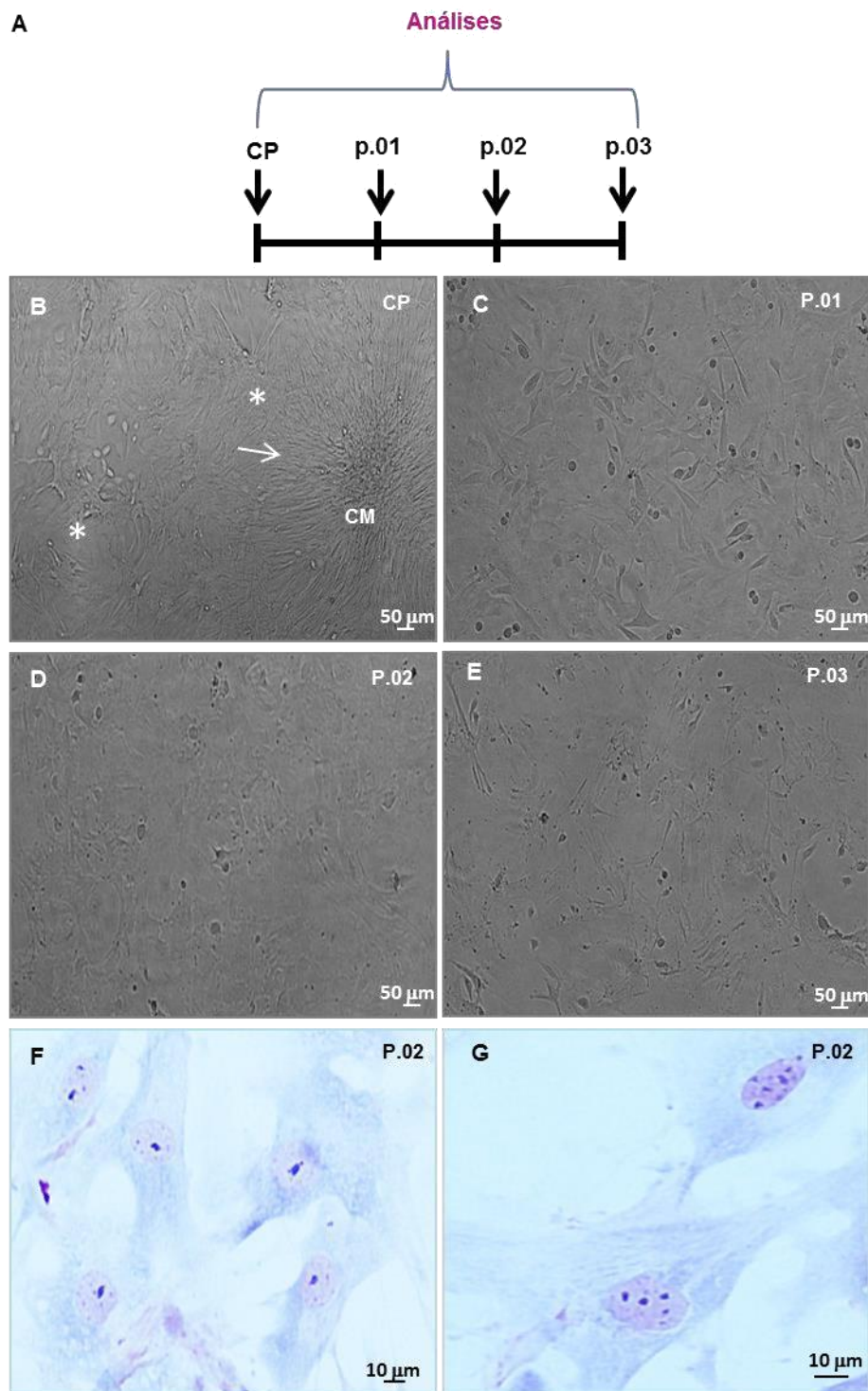


Figura 4.1: Características morfológicas de cultivos de FCs murinos. A: Esquema experimental. B-E: Microscopia de contraste de fase demonstrando o aspecto do cultivo primário (B) e da passagem 1 (C), passagem 2 (D) e passagem 3 (E). Em B a seta indica a presença de grupo de cardiomiócitos (CM) que foram observados contraindo, rodeados por FCs (*) formando monocamada. F e G: Imagens de microscopia de campo claro de culturas coradas com Giemsa demonstrando células com formato fusiforme, citoplasma emitindo prolongamentos, além do núcleo oval e grande com nucléolos evidentes, características de fibroblastos.

4.1.2 Caracterização do enriquecimento das culturas de células cardíacas em fibroblastos através de Western Blotting e imunofluorescência

Para verificarmos qual seria a passagem em que teríamos o enriquecimento das culturas em FCs analisamos a expressão de tropomiosina sarcomérica, um marcador específico de célula muscular estriada (Perry, 2001), uma vez que o cardiomiócito é o principal contaminante das culturas. Para tal, as células cardíacas foram plaqueadas em diferentes passagens, desde o cultivo primário até a passagem 5 para análise da expressão proteica por *Western Blotting* (figura 4.2 A). Nossos resultados revelaram marcação positiva para tropomiosina sarcomérica (TS) apenas no cultivo primário (CP), indicando que a partir da primeira passagem as células musculares cardíacas já não estavam mais presentes nas culturas (figura 4.2 B). Avaliamos também a expressão de fibronectina visando demonstrar que as células encontravam-se funcionais. A expressão de fibronectina foi visualizada em todas as amostras (figura 4.2 B). Desta forma, por uma questão de segurança, definimos realizar os nossos experimentos a partir da segunda passagem (p.02). Ainda, a fim de confirmar esses dados, analisamos as culturas de FCs na segunda passagem quanto à expressão de TS por *Western Blotting* e avaliamos o percentual de células TS positivas por imunofluorescência (figura 4.3 A). Através de *Western Blotting*, verificamos expressão de TS somente nas amostras de coração fetal de camundongos, utilizadas como controle positivo (figura 4.3 B). A expressão de α -SMA foi também avaliada. Verificamos expressão de α -SMA em todas as condições, demonstrando que as células encontravam-se funcionais (figura 4.3 B). Além disso, nossos resultados de imunofluorescência revelaram que menos de 5% das células apresentavam marcação positiva para TS (figura 4.3 C e D); demonstrando alto índice de enriquecimento dos cultivos de FCs (>95%). Diante da ausência de um marcador específico para fibroblastos, através de *Western Blotting* caracterizamos a expressão de DDR2 (figura 4.4 A), que vem sendo considerado um marcador específico de FCs (Goldsmith *et al.* 2004). Nossos resultados revelaram a presença desta proteína nos nossos cultivos em todos os tempos analisados (de 24, 48 e 72h de plaqueamento) (figura 4.4 B).

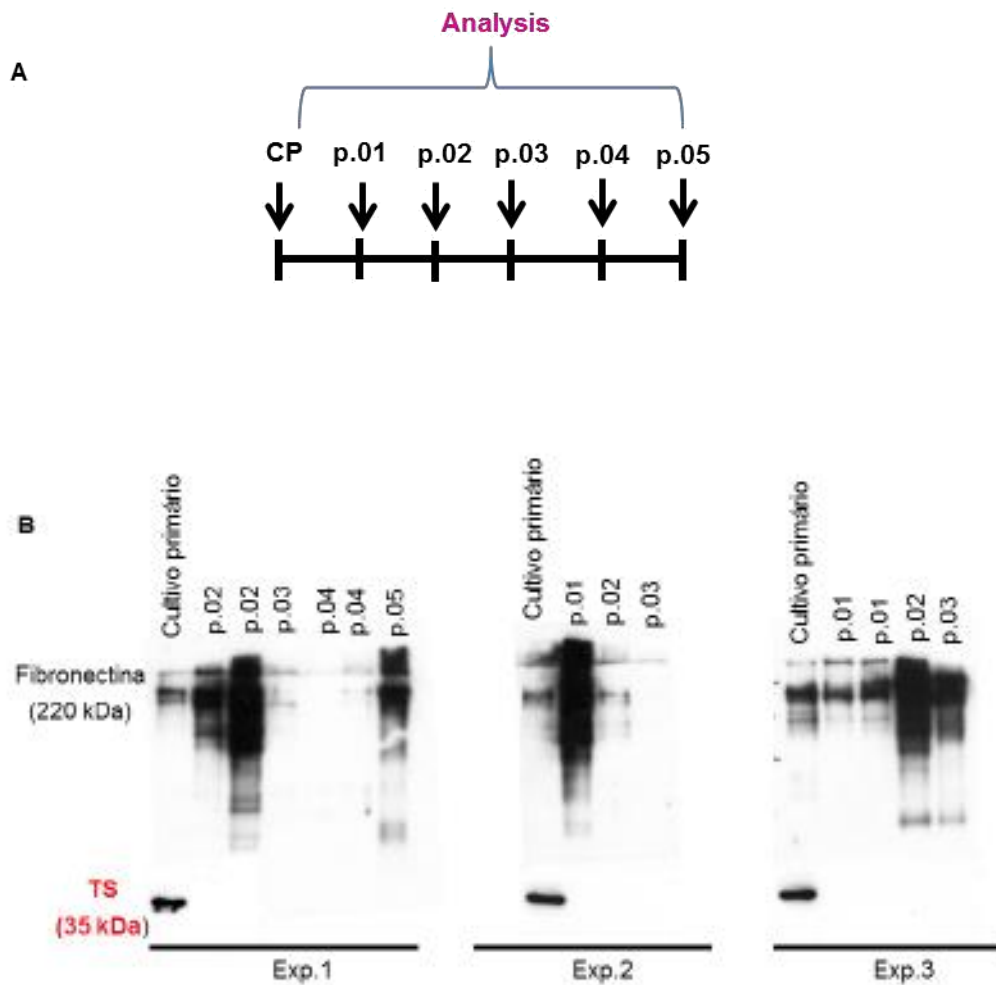


Figura 4.2: Caracterização da expressão de tropomiosina sarcomérica na cultura de fibroblastos cardíacos em diferentes passagens. A: Esquema experimental. B: *Western Blotting* representativo da expressão *in vitro* de fibronectina e tropomiosina sarcomérica em diferentes passagens demonstrando expressão de fibronectina em todas as condições de estudo enquanto que a expressão de tropomiosina sarcomérica foi visualizada apenas nos cultivos primários. p= passagem; Exp.=experimento. Dados representativos de 3 experimentos independentes.

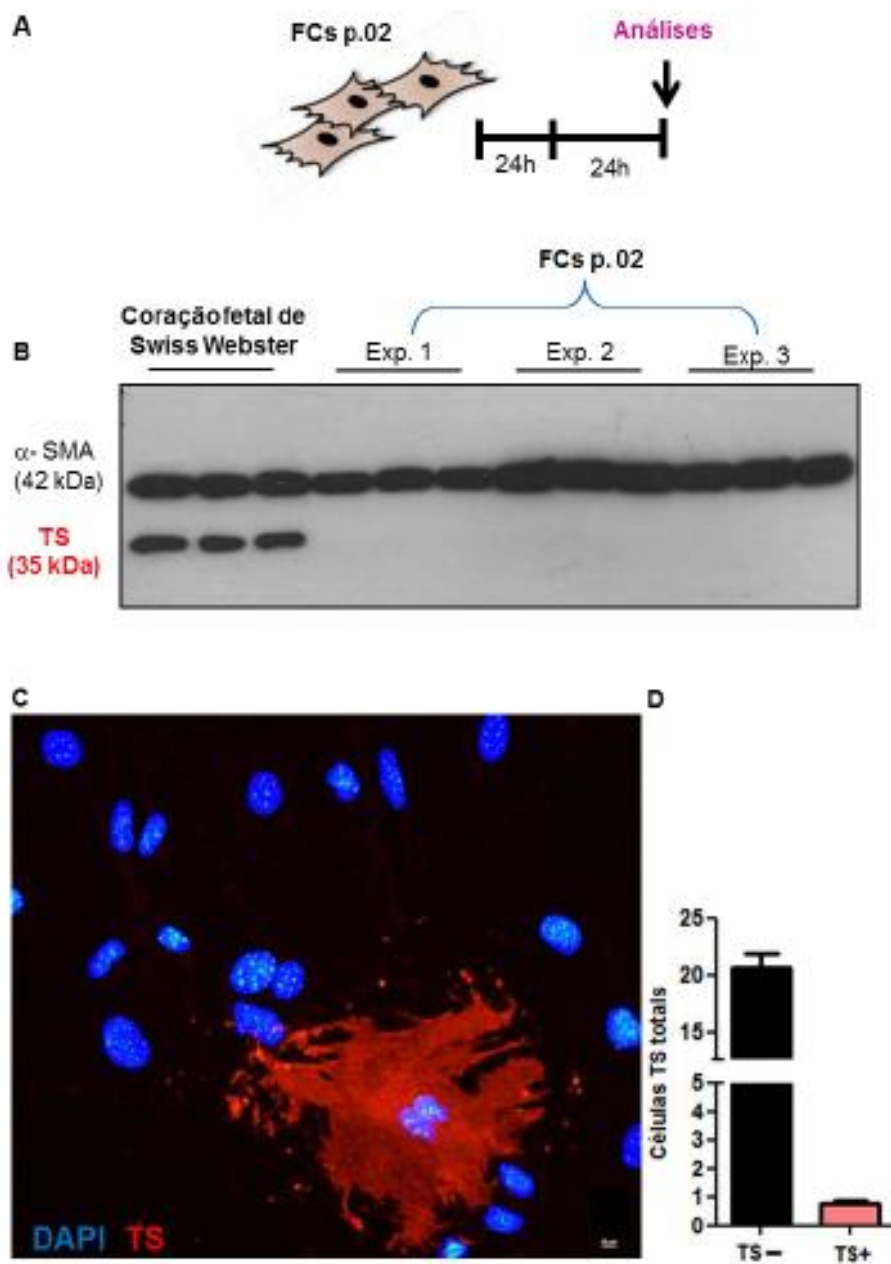


Figura 4.3: Caracterização da expressão de tropomiosina sarcomérica na cultura de fibroblastos cardíacos através de *Western Blotting* e imunofluorescência. A: Esquema experimental. B: *Western Blotting* representativo da expressão *in vitro* de α -SMA e tropomiosina sarcomérica demonstrando expressão de α -SMA em todas as amostras enquanto que a expressão de tropomiosina sarcomérica foi visualizada somente nas amostras de coração fetal de camundongos Swiss Webster. Exp.= experimento. Imagem representativa (C) e gráfico (D) do número de células tropomiosina sarcomérica totais, por imunofluorescência, revelando que <5% das células apresentam marcação para esta proteína (em vermelho). Núcleos foram marcados com DAPI (em azul). Dados representativos da média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes.

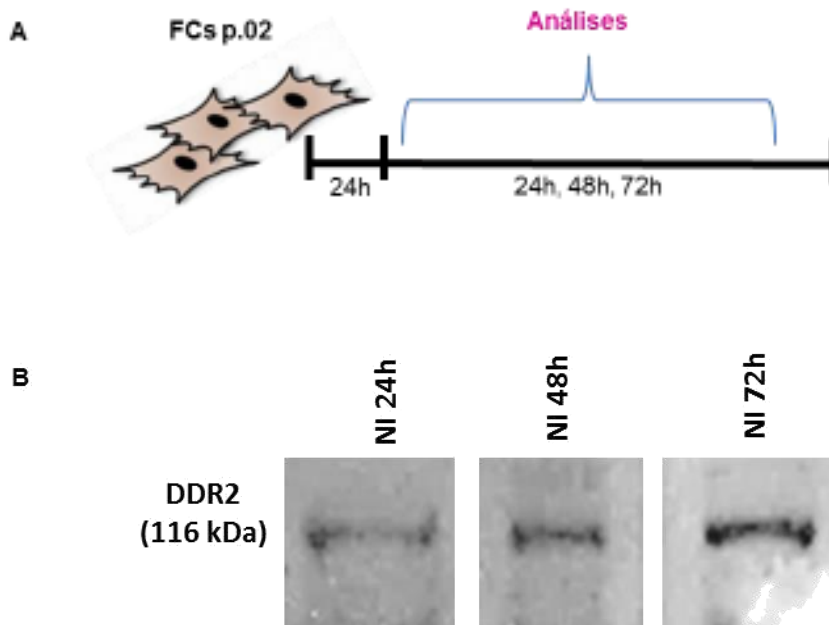


Figura 4.4: Caracterização da expressão de DDR2 na cultura de fibroblastos cardíacos. A: Esquema experimental. B: *Western Blotting* representativo da expressão *in vitro* de DDR2 demonstrando que a presença do marcador de FCs pode ser observada em diferentes tempos de cultivo.

4.1.3 Características funcionais

A fim de caracterizar funcionalmente nossos cultivos, analisamos através da técnica de *Western Blotting* a síntese de componentes de ECM em diferentes tempos de plaqueamento: 6h, 24h, 48h e 72h, como indicado na figura (figura 4.5 A). Avaliamos ainda a presença de miofibroblastos, caracterizados pela expressão da proteína de citoesqueleto alfa-actina de músculo liso (α -SMA). A análise da expressão de proteínas de ECM revelou o aumento da expressão de laminina em 48h de plaqueamento (figura 4.5 B), enquanto que a expressão de fibronectina aumentou ao longo do tempo de cultivo (figura 4.5 C). Imagens representativas da marcação para estas proteínas com 72h de cultivo podem ser visualizadas nas figuras 4.6 B e C, respectivamente. Conseguimos observar inclusive formação de rede fibrilar sugestivo de deposição de fibronectina (figura 4.6 C). Observamos aumento na expressão de α -SMA nos tempos finais de cultivo (48h e 72h) demonstrando diferenciação de FCs em miofibroblasto (figura 4.5 D); na figura 4.6 D, podemos observar uma imagem representativa do padrão de marcação para essa proteína com 72h de cultivo, por imunofluorescência. Sintetizando os dados até o momento, vimos que foi possível obter e estabelecer a cultura de FCs, em que as células apresentam características biológicas (morfológicas e funcionais) preservadas. Tais achados nos permitiu dar o próximo passo, ou seja, estabelecer e caracterizar *in vitro* a infecção pelo *T. cruzi* nos FCs.

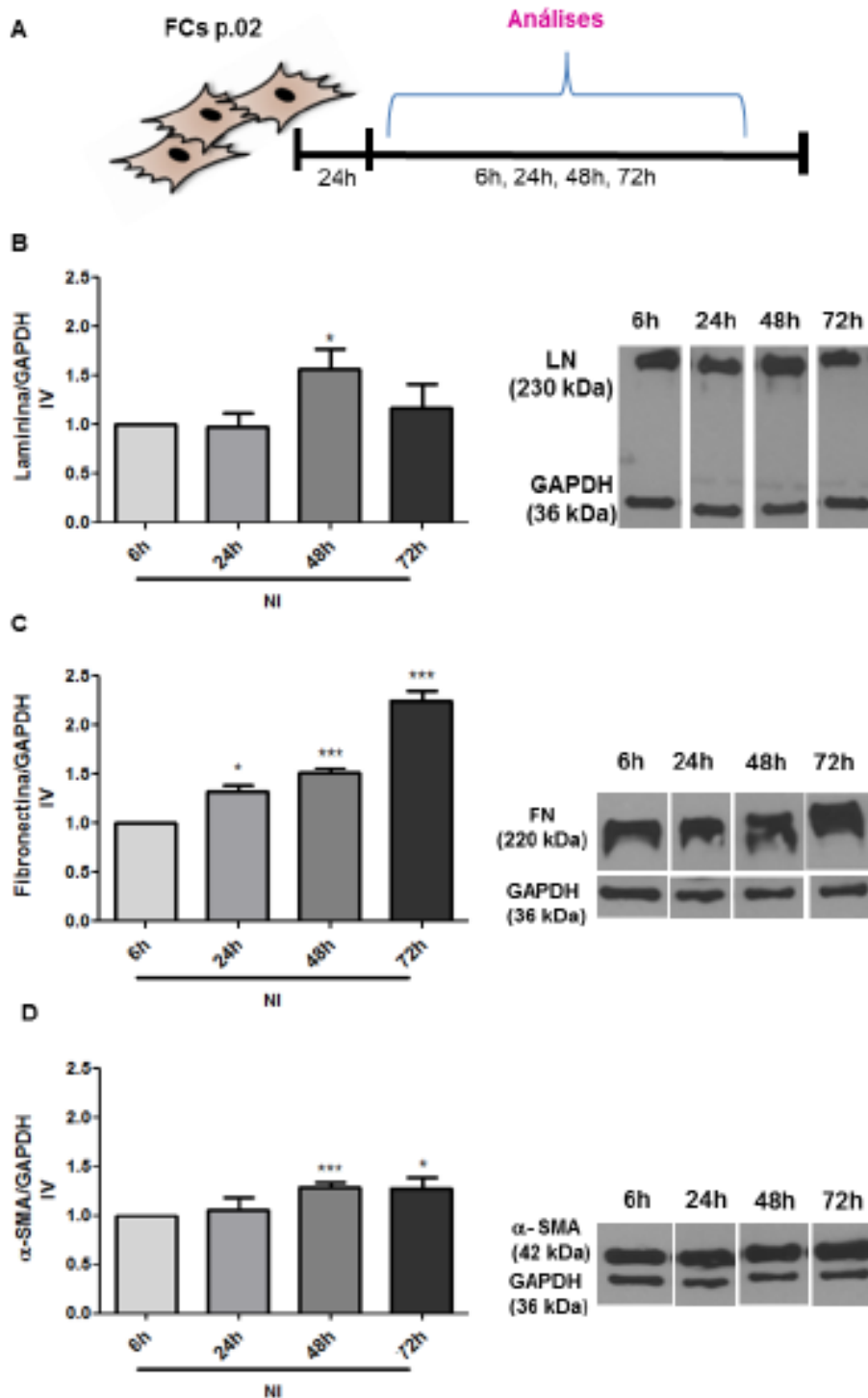


Figura 4.5: Características funcionais de cultivos de FCs murinos. A: Esquema experimental. B-D: Análise quantitativa da expressão de laminina, fibronectina e α -SMA, respectivamente, por *Western Blotting* durante 6h a 72h de cultivo. Os valores são expressos como Índice de Variação (IV) das médias das amostras analisadas pela média do tempo de 6h \pm desvio padrão. Dados representativos de 3 experimentos. GAPDH foi utilizado como controle interno das amostras. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. *One-way ANOVA*. Pós-teste: Tukey.

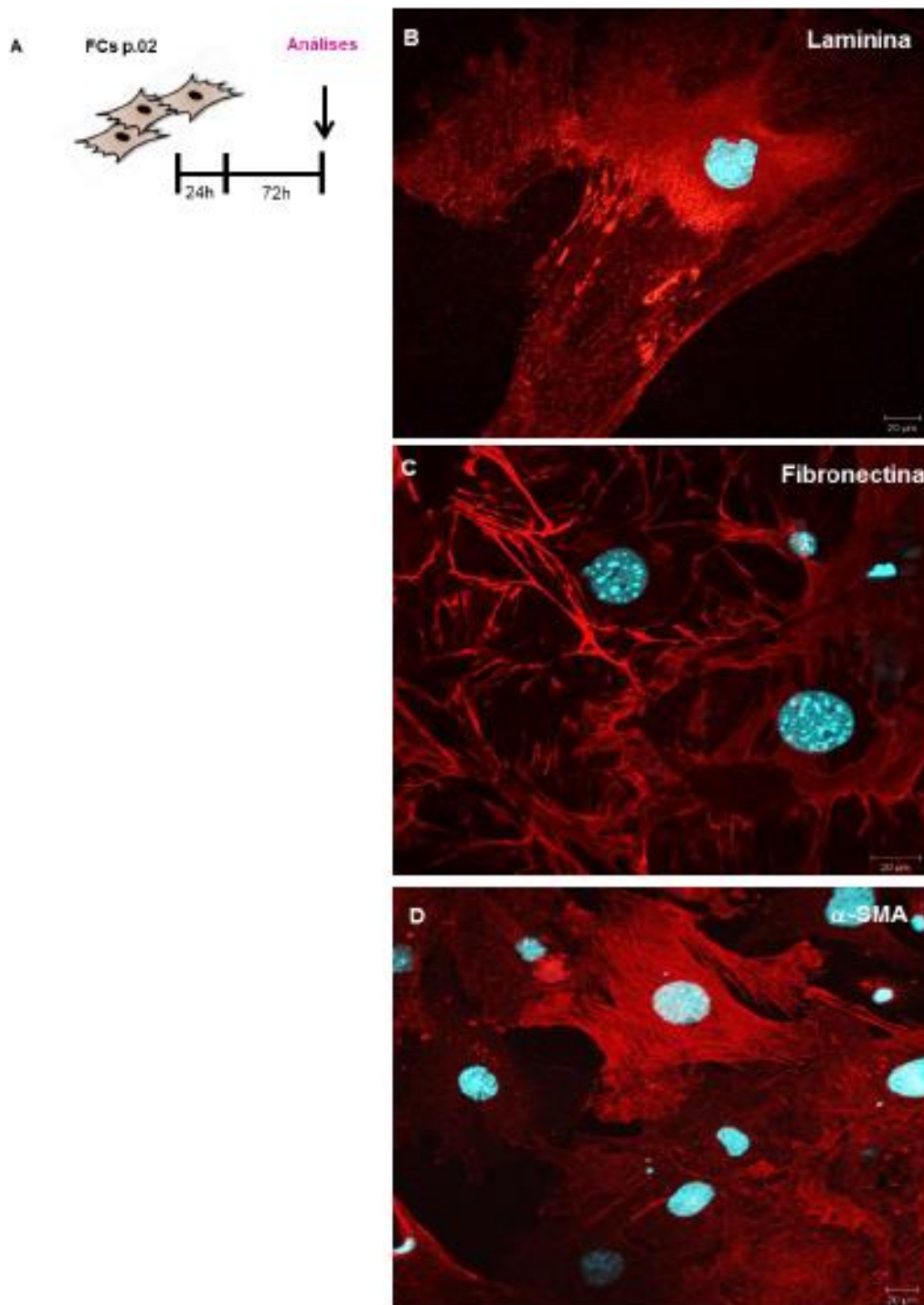


Figura 4.6: Caracterização por imunofluorescência da expressão de proteínas de matriz extracelular e alfa actina de músculo liso nas culturas de fibroblastos cardíacos. A: Esquema experimental. B-D: Imagens representativas da expressão de laminina (B), fibronectina (C) e α -SMA (D) (vermelho). Núcleos marcados em azul (DAPI).

4.2 Infecção *in vitro* pelo *T. cruzi* e ciclo do parasita nos FCs

Após 24 horas de cultivo, os FCs foram infectados com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, utilizando-se MOI de 10 e a infecção foi mantida por 6h, 24h, 48h, 72h e 96h, conforme indicado na figura 4.7 A. Através das análises por microscopia de campo claro das culturas coradas com Giemsa, verificamos que o *T. cruzi* foi capaz de infectar os fibroblastos cardíacos *in vitro* (figura 4.7 B), se diferenciar em amastigostas (figura 4.7 C), proliferar (figura 4.7 D e E), se diferenciar em tripomastigostas novamente, evadir as células infectadas, aderindo e infectando novas células, dando continuidade ao ciclo (figura 4.7 F e G), confirmando dados prévios da literatura em culturas mistas de células cardíacas (Meirelles *et al.*, 1986). Avaliamos também o percentual de infecção no período de 6-72h e observamos que após 6h de interação parasita-célula hospedeira, 10% dos FCs apresentavam-se infectados. Após 24h de interação, realizamos as lavagens das culturas e observamos aproximadamente 40% de infecção. Este percentual se manteve nos tempos de 48h e 72h pós-infecção (figura 4.7 H). Através da análise da quantidade de parasitas intracelulares, observamos como esperado, um aumento progressivo no número de formas amastigotas no citoplasma das células hospedeiras (figura 4.7 I).

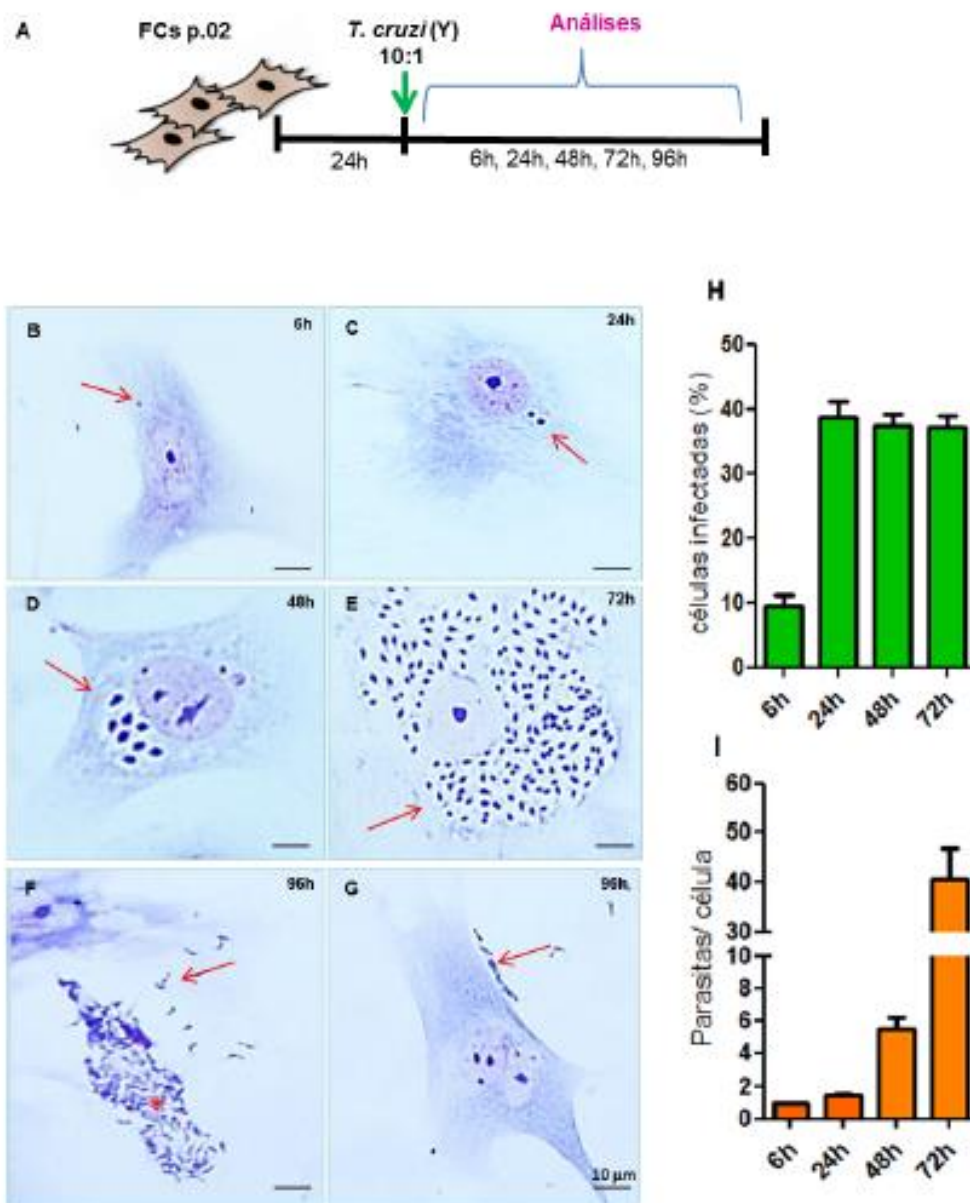


Figura 4.7: Ciclo do *T. cruzi* no fibroblasto cardíaco. A: Esquema experimental. B-G: Imagens representativas de microscopia de campo claro das células coradas com Giemsa mostrando o ciclo intracelular do *T. cruzi* nos FCs. Em B podemos observar a presença de parasitas intracelulares já após 6h de interação do *T. cruzi* (seta). Com 24h podemos observar o início do processo de proliferação das formas amastigotas (seta) (C) que perdura após 48 (D) e 72h (E) pós-infecção (setas). Com 96h de infecção podemos observar grande quantidade de formas tripomastigotas no interior dos FCs (asterisco), evadindo essas células (seta) (F) e aderindo em novos FCs para reiniciar um novo ciclo (seta) (G). Os gráficos demonstram o percentual de células infectadas pelo *T. cruzi*. (H) e o número de parasitas por célula durante o ciclo intracelular do parasita (I). Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de duplicatas de um experimento.

4.3 Efeito da infecção pelo *T. cruzi* sobre a ativação de FCs

Para respondermos à pergunta experimental relativa a capacidade do *T. cruzi* em ativar FCs, analisamos dois dos principais parâmetros de ativação: diferenciação em miofibroblasto e aumento da expressão de componentes de ECM (Baudino *et al.*, 2006, Porter & Turner, 2009).

4.3.1 Efeito sobre a diferenciação de FCs em miofibroblastos

Após 24h de cultivo as células foram infectadas com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* usando MOI de 10 e a infecção foi mantida por 6h, 24h, 48h e 72h (figura 4.8 A). Avaliamos a cinética de expressão de α -SMA através da técnica de *Western Blotting*. Nossos resultados indicaram um aumento na expressão de α -SMA nos tempos de 6h e 24h pós-infecção e diminuição nos tempos de 48h e 72h, quando comparamos com os cultivos não infectados (NI) referentes ao mesmo tempo de estudo (figura 4.8 B). Através de imunofluorescência nós caracterizamos a distribuição desta proteína no tempo inicial (24h) e final (72h) de infecção. Após 24h de infecção observamos maior marcação nas culturas infectadas sem alteração no padrão de organização dos filamentos de α -SMA (figura 4.8 C e D). Após 72h de infecção, foi possível observar redução da marcação para esta proteína e alteração na organização dos seus filamentos (figura 4.8 E e F).

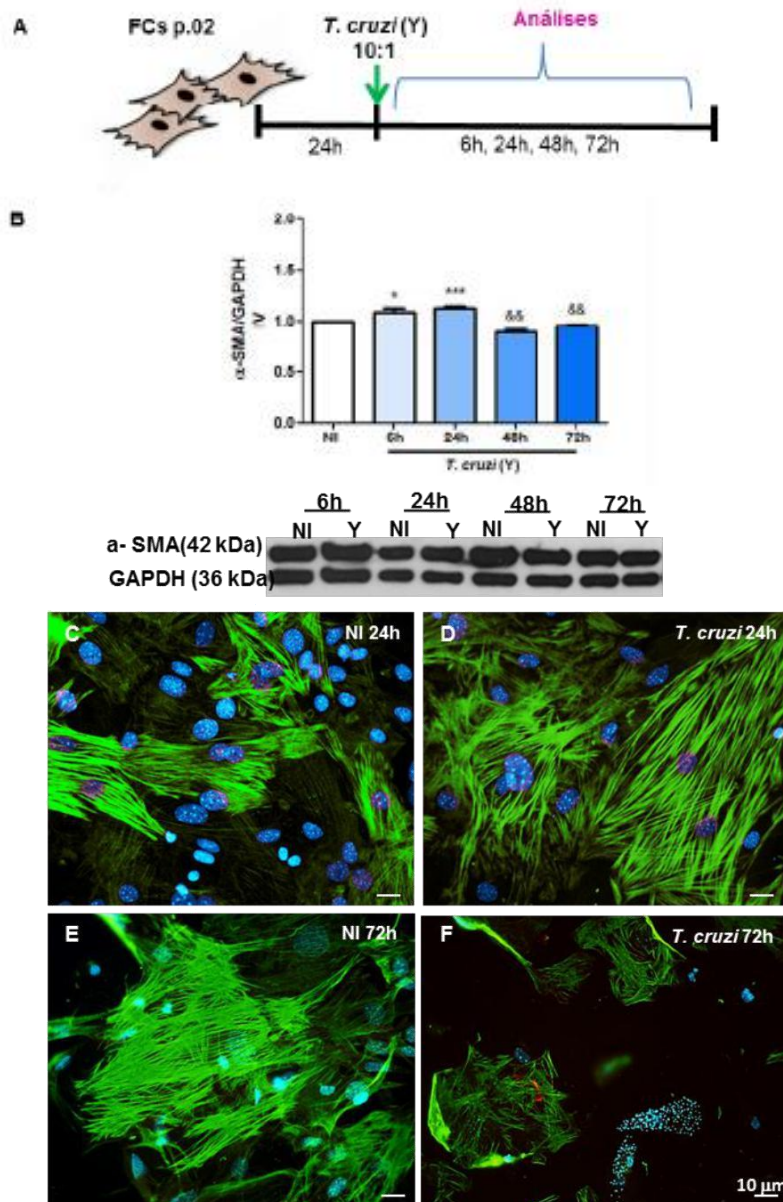


Figura 4.8: Efeito da infecção pelo *T. cruzi* sobre a diferenciação de FCs. A: Esquema experimental. B: Análise quantitativa e *Western Blotting* representativo da expressão de α -SMA em cultivos de FCs. Nos tempos de 6h e 24h observamos aumento da expressão de α -SMA e queda nos tempos de 48h e 72h (B). NI= culturas não infectadas; Y= culturas infectadas pelo *T. cruzi*. Os valores são expressos como Índice de Variação (IV) das médias das amostras analisadas pela média dos seus respectivos controles (cultivos não infectados (NI) referentes ao mesmo tempo de estudo) \pm desvio padrão. GAPDH foi utilizado como controle interno das amostras. Dados representativos da média de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ (estímulo); && $p < 0,01$ (inibição); *** $p < 0,001$ (estímulo). *One-way* ANOVA. Pós-teste: Tukey. C-F: Imunofluorescência para α -SMA (verde) mostrando o padrão de marcação dos filamentos de α -SMA nas culturas não infectadas (C e E) e infectadas (D e F). Após 24h de infecção (D) é possível observar aumento da marcação de α -SMA em comparação ao controle não infectado (C). Em F observamos a redução da marcação nas culturas infectadas após 72h bem como, alteração no padrão de distribuição dos filamentos de α -SMA quando comparado ao controle não infectado (E).

4.3.2 Efeito sobre a expressão de componentes de ECM

Após análise da diferenciação celular, investigamos a produção de fibronectina e laminina pelos FCs. Para tal, novamente passadas 24h de cultivo as células foram infectadas com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (MOI de 10) e acompanhadas por 6h, 24h, 48h e 72h de infecção, como indicado na figura 4.9 A; o nível de expressão das proteínas foi avaliado por *Western Blotting*. Comparando com seus respectivos controles NI, as análises revelaram aumento na expressão de fibronectina em 6h, 24h e 48h pós-infecção e queda após 72h (figura 4.9 B). Aumento de expressão de laminina foi também verificado após 6h e 24h de infecção (figura 4.9 C). Nossos resultados demonstram que a infecção pelo *T. cruzi* ativa os FCs através da indução não somente de diferenciação celular, mas também da expressão de componentes de ECM nos tempos iniciais de infecção.

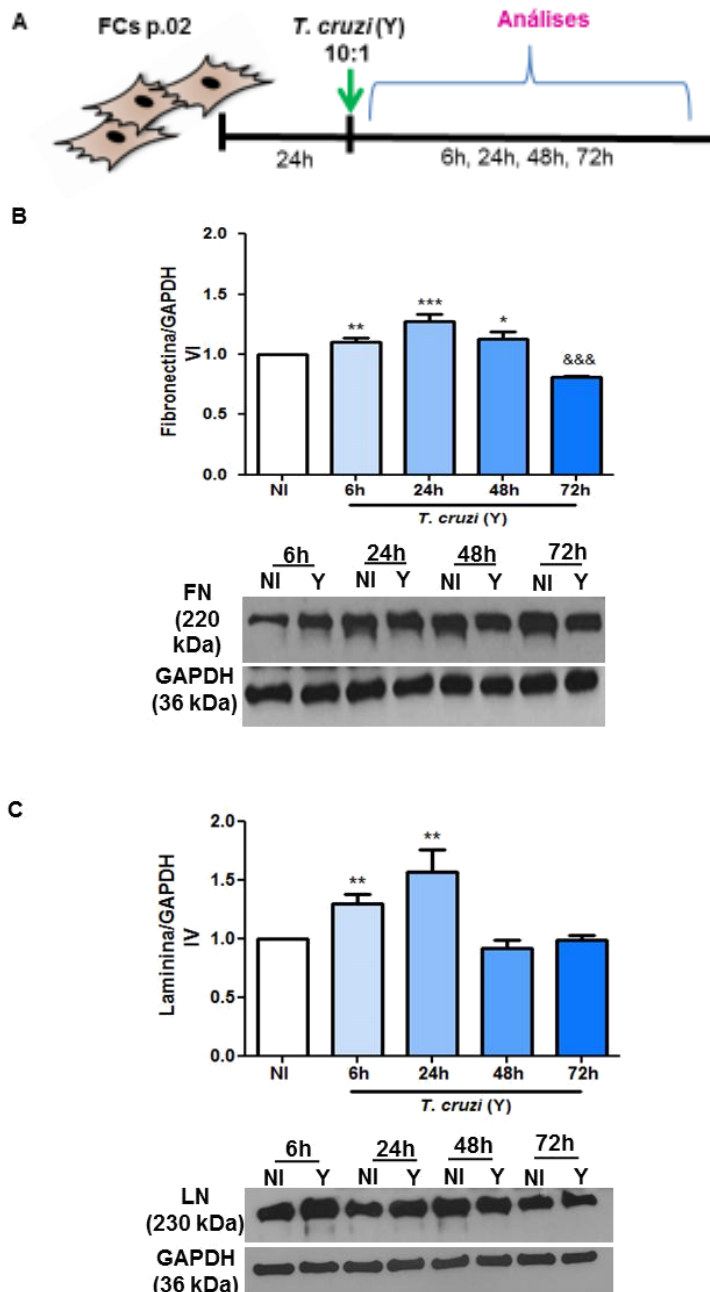


Figura 4.9: Efeito da infecção pelo *T. cruzi* sobre a expressão de componentes de ECM em FCs. A: Esquema experimental. B e C: Análise quantitativa da expressão fibronectina (FN) (B) e laminina (LN) (C) por *Western Blotting* em cultivos de FCs. Em B, é possível observar aumento da expressão de fibronectina após 6h, 24h e 48h de infecção e queda após 72h de infecção pelo *T. cruzi*. Aumento de laminina pode ser observado após 6h e 24h de infecção (C). NI= culturas não infectadas; Y= culturas infectadas pelo *T. cruzi*. Os valores são expressos como Índice de Variação (IV) das médias das amostras analisadas pela média dos seus respectivos controles (cultivos não infectados (NI) referentes ao mesmo tempo de estudo) \pm desvio padrão. Dados representativos da média de 3 experimentos independentes. GAPDH foi utilizado como controle interno das amostras. * $p < 0,05$ (estímulo); ** $p < 0,01$ (estímulo); *** $p < 0,001$ (estímulo) &&& $p < 0,001$ (inibição). *One-way ANOVA*. Pós-teste: Tukey.

4.4 Efeito do pré-tratamento de culturas de FCs com TNF durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Nos resultados anteriores demonstramos que a infecção pelo *T. cruzi per se* é capaz de ativar os FCs, através da indução de diferenciação celular e expressão de proteínas de ECM. Contudo, devido a reconhecida contribuição da inflamação para o desenvolvimento da CCC (Marin-Neto *et al.*, 2007) e uma vez que os FCs são principalmente ativados em respostas às citocinas como o TNF (Wynn & Ramalingam, 2012), a qual encontra-se em altas concentrações séricas em pacientes crônicos com alterações cardíacas graves (Pérez *et al.*, 2011), resolvemos investigar o efeito do tratamento com TNF sobre os FCs. Após 24h de cultivo, TNF em diferentes concentrações (0,1 ng/ mL; 3 ng/ mL; 30 ng/ mL) foi adicionado ao cultivo de FCs 2 horas antes da infecção e seu estímulo foi mantido durante 24h.

4.4.1 Produção de TNF pelos FCs

FCs são fontes primárias de TNF no coração (Yokoyama *et al.*, 1999; Shames *et al.*, 2002). Nesse sentido, avaliamos a produção dessa citocina pelos FCs não infectados e infectados, sob influência ou não do próprio TNF (figura 4.10 A). A análise da produção de TNF por ELISA revelou que nas nossas condições de estudo, não foi possível detectar esta citocina no sobrenadante das culturas FCs, mesmo durante a infecção pelo *T. cruzi*. O pré-tratamento com TNF das culturas não infectadas e infectadas resultou em concentrações detectáveis da citocina, porém muito abaixo das quantidades adicionadas ao sistema (figura 4.10 B), sugerindo que a citocina pode estar sendo consumida e/ou degradada. A curva-padrão da citocina está representada na figura 4.10 C. Para facilitar a interpretação dos dados, uma vez que as concentrações de TNF adicionadas estão na ordem de ng/mL e o gráfico do TNF produzido é representado em pg/mL, construímos um gráfico das concentrações de TNF exógeno adicionadas convertidas em pg/mL (Figura 4.10 D).

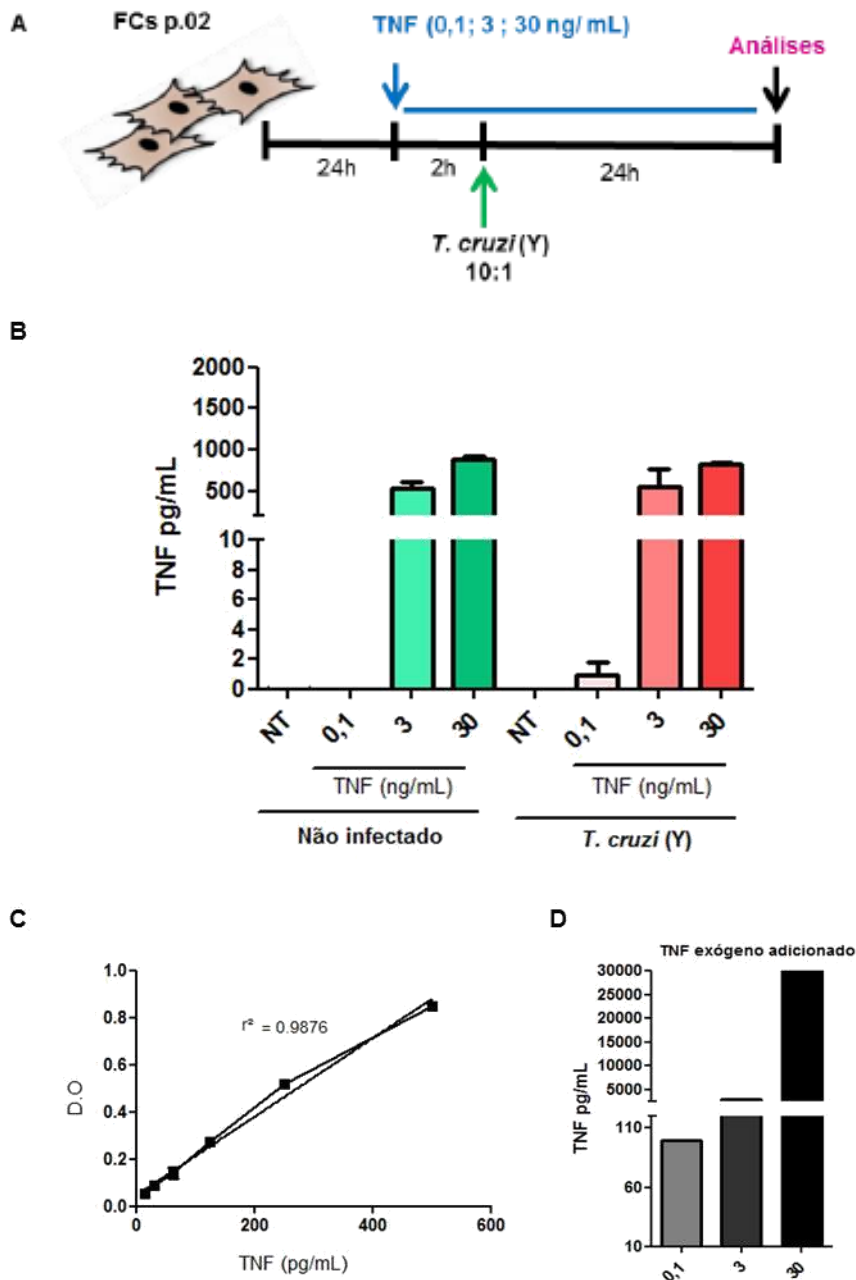


Figura 4.10: Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a produção de TNF pelos FCs durante infecção pelo *T. cruzi*. A: Esquema experimental. B: Gráfico quantitativo da produção de TNF pelos FCs por ELISA, nas diferentes condições de estudo, demonstrando que as concentrações de TNF detectadas foram menores que as quantidades de TNF adicionadas nas culturas, de acordo com o gráfico de TNF exógeno adicionado (D). C: Curva-padrão de TNF. Os dados são apresentados como a média±desvio padrão de 3 experimentos.

4.4.2 Efeito do TNF sobre a produção de NO pelos FCs

Avaliamos também a produção de NO pelos FCs (figura 4.11 A), já que é um mediador inflamatório que também se encontra em altas concentrações no soro de pacientes com a forma grave da CCC (Pérez *et al.*, 2011). A produção de NO foi verificada pelo método de Griess e nas nossas condições experimentais, detectamos produção de níveis basais deste mediador inflamatório pelos FCs, seja quando estimulados somente com *T. cruzi* ou TNF, ou mesmo utilizando-se os dois estímulos ao mesmo tempo (figura 4.11 B). A curva-padrão de produção de nitrito está representada na figura 4.11 C. Utilizamos como controles positivo e negativo da produção de NO o sobrenadante de macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados ou não com IFN- γ e LPS, respectivamente (Figura 4.11 D).

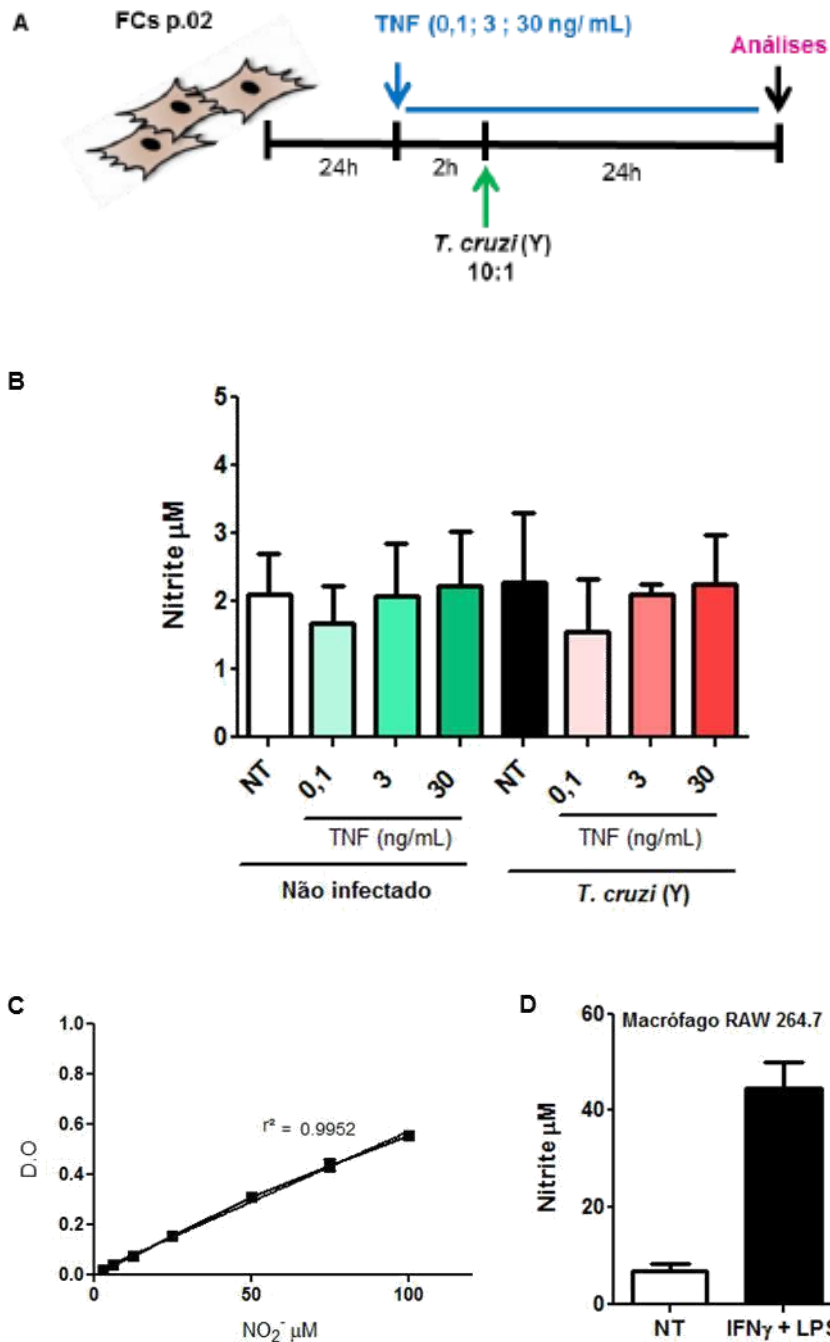


Figura 4.11: Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a produção de NO pelos FCs durante infecção pelo *T. cruzi*. A: Esquema experimental. B: Gráfico quantitativo da produção de nitrito pelos FCs nas diferentes condições de estudo, pelo método de Griess, demonstrando que houve produção de nitrito em níveis basais. C: Curva-padrão de nitrito. D: Gráfico da produção de nitrito pelos macrófagos da linhagem RAW 264.7, utilizado como controle do ensaio. Os dados são apresentados como a média±desvio padrão de 3 experimentos independentes.

4.4.3 Efeito do TNF sobre a infecção de FCs

Em seguida, investigamos se o TNF poderia influenciar na infecção de FCs pelo *T. cruzi*. As análises tanto do percentual de infecção quanto do número de parasitas por célula infectada foi feita através da identificação dos parasitas pelo DAPI (figura 4.12 A). Verificamos que o pré-tratamento com TNF reduziu o percentual de células infectadas em todas as concentrações utilizadas, quando comparamos com a as culturas infectadas e não tratadas (figura 4.12 B-F). Além disso, ao analisarmos o número de parasitas intracelulares, observamos que baixas concentrações de TNF (0,1 ng/ mL) também reduziram a quantidade de parasitas por célula (figura 4.12 G). Assim, nossos dados demonstram que, nas nossas condições de estudo, o tratamento prévio de FCs com TNF reduz a taxa de infecção pelo *T. cruzi*.

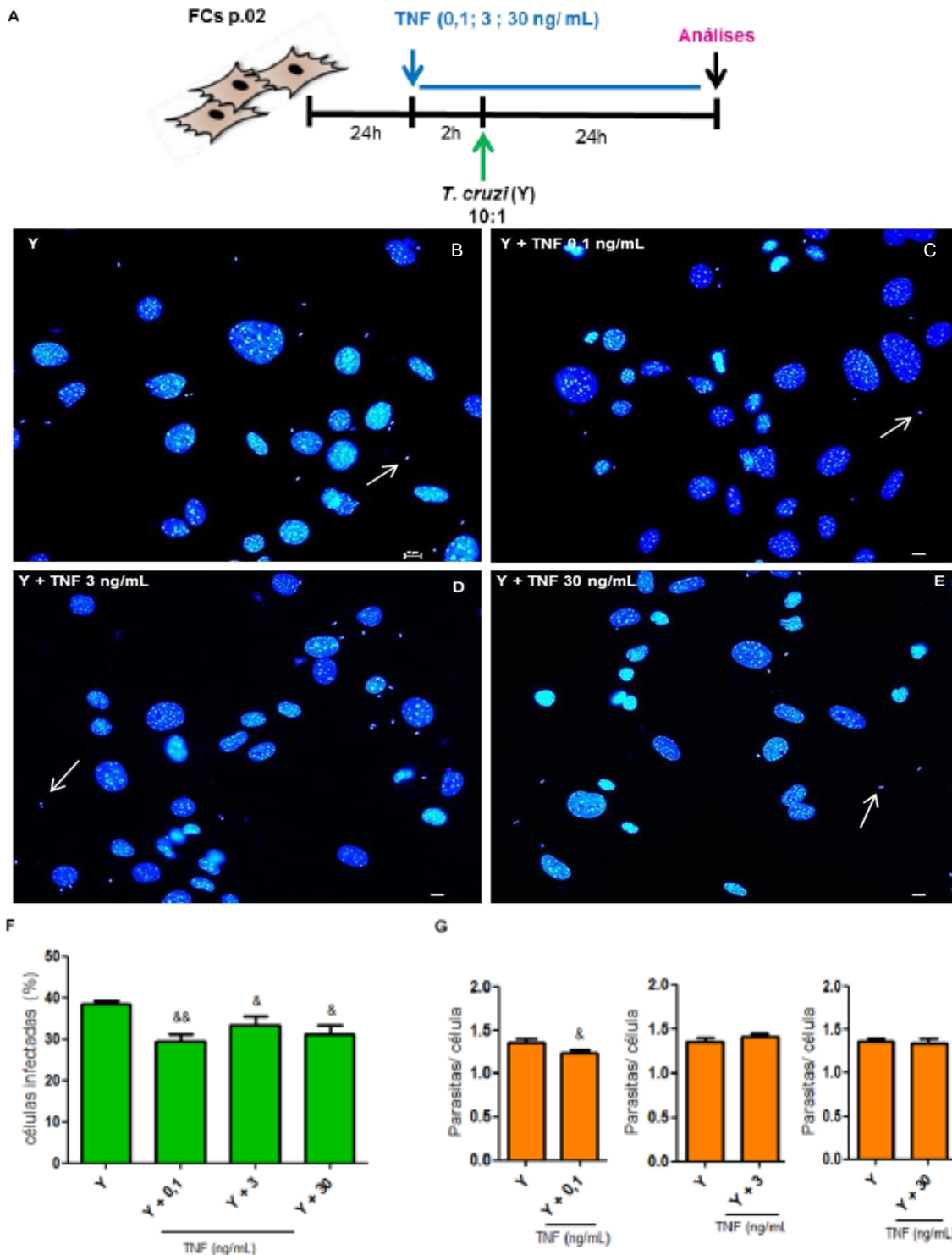


Figura 4.12: Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a infecção de FCs pelo *Trypanosoma cruzi*. A: Esquema experimental. B-E: Imagens representativas da infecção avaliada através de fluorescência. Núcleos e cinetoplastos estão marcados com DAPI (em azul). Setas indicam formas amastigotas. F e G: Gráficos do percentual de células infectadas pelo *T. cruzi* (F) e do número de parasitas por células infectadas (G), demonstrando que o tratamento com TNF foi capaz de reduzir a infecção em FCs. O efeito sobre os parasitas intracelulares foi observado apenas na menor concentração utilizada (G). Os dados são apresentados como a média±desvio padrão de 3 experimentos independentes. & $p < 0,05$ (inibição). && $p < 0,01$ (inibição). One-way ANOVA. Pós-teste: Tukey (F). t-Student não pareado (G).

4.4.4 Efeito do TNF sobre a diferenciação de FCs em miofibroblastos

Avaliamos também se o TNF poderia ativar os FCS através da indução de diferenciação celular, pela análise da expressão proteica de α -SMA por *Western Blotting* (figura 4.13 A). Verificamos que o tratamento com TNF não interferiu na expressão α -SMA pelos FCs seja nos cultivos NI (figura 4.13 B) quanto durante a infecção pelo *T. cruzi* (figura 4.13 C), quando comparamos com as respectivas condições controles (NI e infectados sem a citocina). Esse resultado sugere que o TNF, nessas condições experimentais, não induz diferenciação de FCs em miofibroblasto.

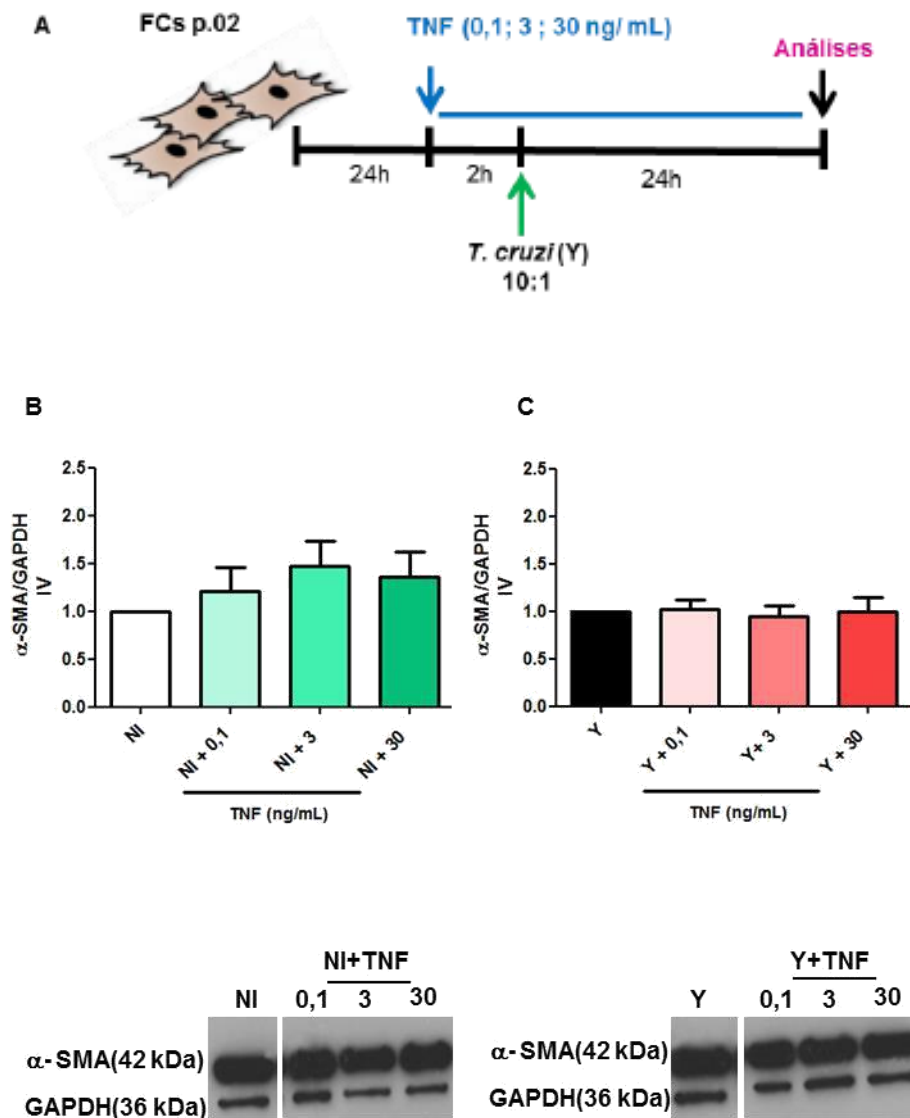


Figura 4.13: Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a diferenciação de FCs durante a infecção pelo *T. cruzi*. A: Esquema experimental. B e C: Análise quantitativa da expressão de α -SMA através de Western Blotting nas diferentes condições de estudo, mostrando que o TNF não interferiu na expressão da proteína pelos FCs. NI= culturas não infectadas; Y= culturas infectadas pelo *T. cruzi*. Os valores são expressos como Índice de Variação (IV) das médias das amostras analisadas pela média dos seus respectivos controles (NI ou Y) \pm desvio padrão. Dados representativos da média de 3 experimentos independentes. GAPDH foi utilizado como controle interno das amostras.

4.4.5 Efeito do TNF sobre a expressão de componentes de ECM em FCs

Além da análise de diferenciação celular, nos propusemos a avaliar o efeito do TNF sobre a produção de fibronectina (figura 4.14 A) e laminina (figura 4.15 A). Não observamos diferença na expressão de ambas as proteínas quando os cultivos não infectados (figuras 4.14 B e 4.15 B) e infectados (figuras 4.14 C e 4.15 C) foram estimulados com o TNF. Com esses últimos achados, demonstramos que nas condições dos nossos ensaios, o tratamento com TNF não estimula a ativação de FCs, revelada através de dois principais parâmetros: marcador de diferenciação celular e expressão de componentes de ECM.

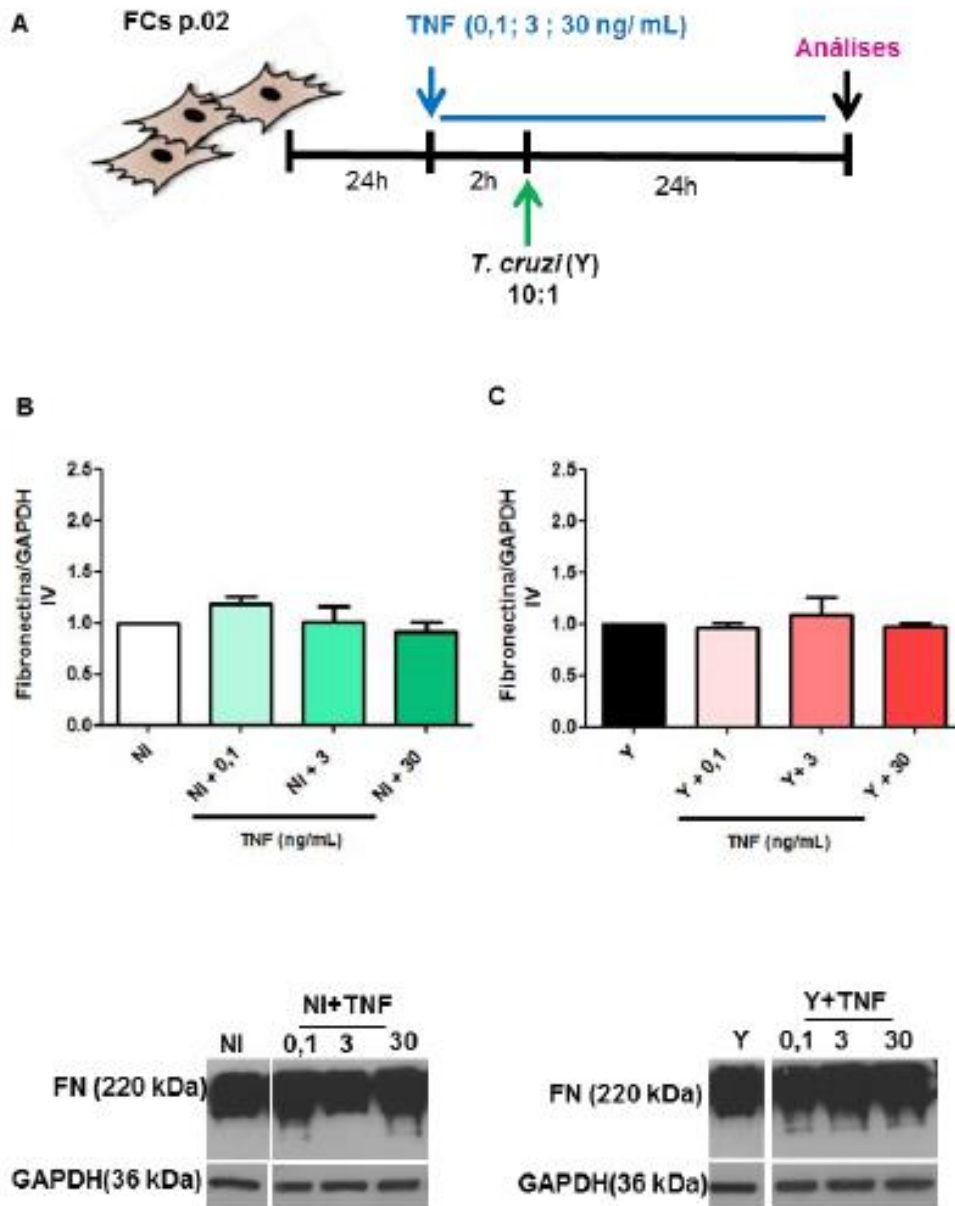


Figura 4.14: Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a expressão de fibronectina pelos FCs durante infecção pelo *T. cruzi*. A: Esquema experimental. B e C: Análise quantitativa da expressão de fibronectina (FN) (B e C) por Western Blotting em cultivos de FCs. As análises demonstram que o TNF não interferiu na expressão da proteína pelos FCs. NI= culturas não infectadas; Y= culturas infectadas pelo *T. cruzi*. Os valores são expressos como Índice de Variação (IV) das médias das amostras analisadas pela média dos seus respectivos controles (NI ou Y) \pm desvio padrão. Dados representativos da média de 3 experimentos independentes. GAPDH foi utilizado como controle interno das amostras.

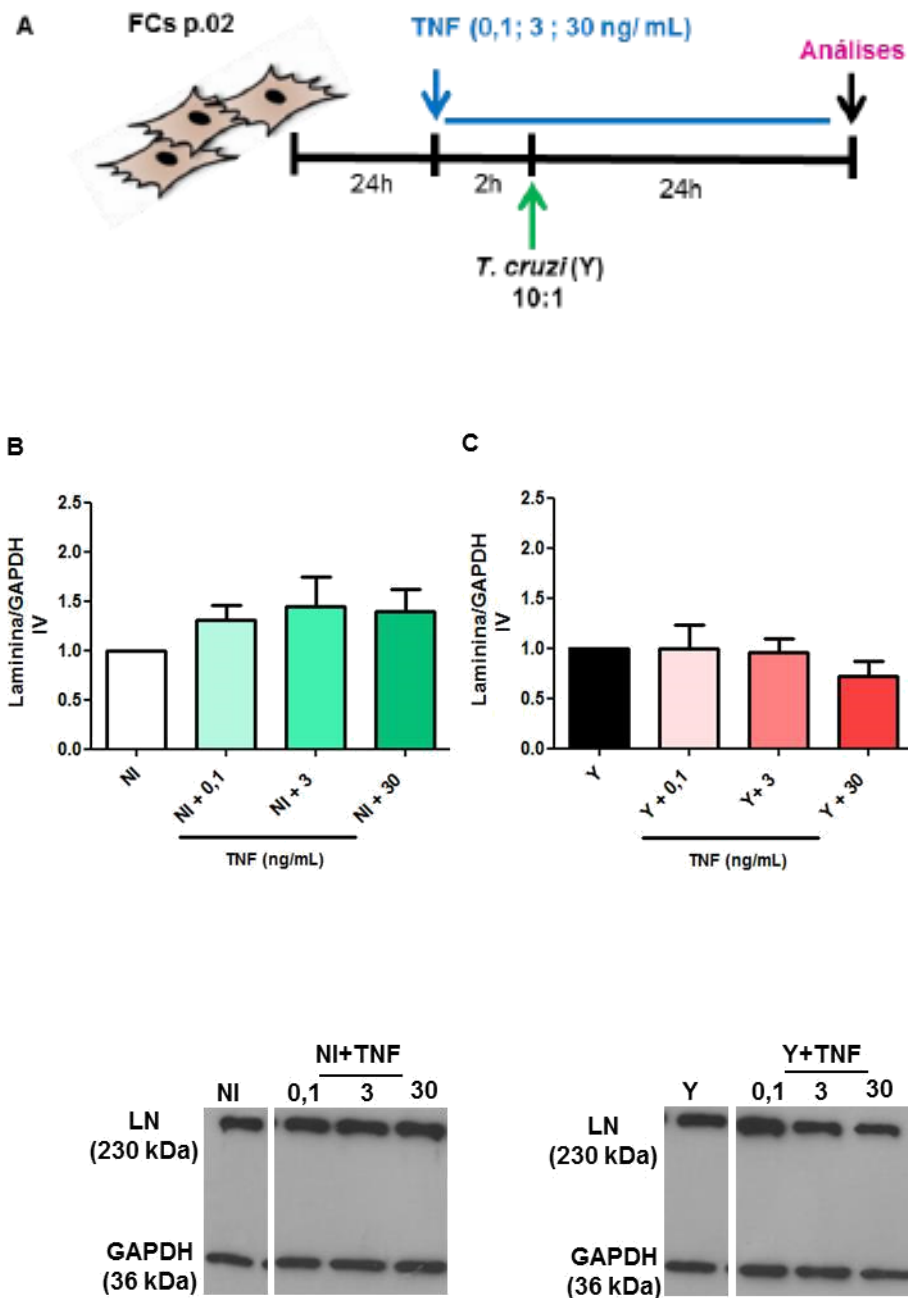


Figura 4.15: Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a expressão de laminina pelos FCs durante infecção pelo *T. cruzi*. A: Esquema experimental. B e C: Análise quantitativa da expressão de laminina (LN) (B e C) por *Western Blotting* em cultivos de FCs. As análises demonstram que o TNF não interferiu na expressão de laminina pelos FCs. NI= culturas não infectadas; Y= culturas infectadas pelo *T. cruzi*. Os valores são expressos como Índice de Variação (IV) das médias das amostras analisadas pela média dos seus respectivos controles (NI ou Y) \pm desvio padrão. Dados representativos da média de 3 experimentos independentes. GAPDH foi utilizado como controle interno das amostras.

4.4.6 Efeito do TNF sobre a proliferação de FCs

Os resultados anteriores nos levaram a investigar outro parâmetro de ativação: a proliferação celular (figura 4.16 A). A proliferação foi analisada através da expressão de Ki-67 por imunofluorescência. Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em células proliferativas (Zcholzhen & Gerdes, 2000). Nossos resultados revelaram que com 24h de infecção: a) somente a infecção pelo *T. cruzi* não interfere no percentual de células ki-67+; b) somente o tratamento com TNF (3 ng/mL) induziu aumento de frequência de células ki-67+, sendo este efeito exacerbado pela infecção (condição Y + TNF 3 ng/ mL); c) houve aumento de proliferação quando os FCs foram submetidos aos dois estímulos, o pré-tratamento com TNF nas três concentrações utilizadas (0,1 ng/ mL; 3 ng/ mL; 30 ng/ mL) e a infecção pelo *T. cruzi* (figura 4.16 B e C). Nossos dados mostram que a citocina inflamatória TNF influencia o processo de proliferação de FCs. Também, nossos dados indicam que na presença de TNF e do parasita há maior frequência de células expressando o marcador de proliferação celular ki-67 em cultivos de FCs.

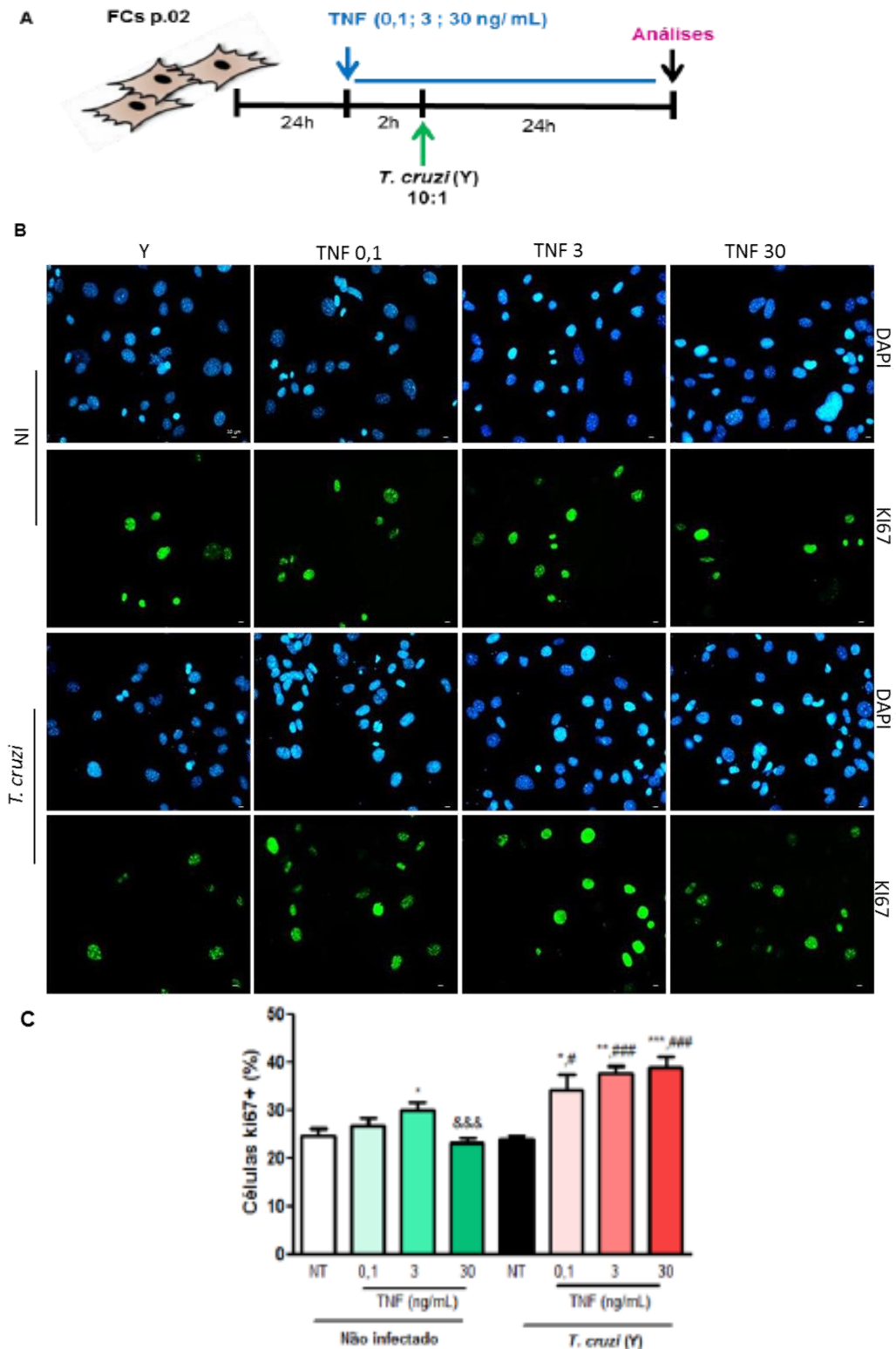


Figura 4.16: Efeito do pré-tratamento com TNF sobre a proliferação de FCs durante infecção pelo *T. cruzi* avaliada através da imunofluorescência para ki-67. A: Esquema experimental. B: Imagens representativas da marcação para ki-67 (núcleo em verde) e DAPI (núcleo em azul) nas diferentes condições de estudo. C: Análise quantitativa do percentual de células ki-67+ demonstrando que o TNF interfere na proliferação de FCs. NT= não tratado; NI= culturas não infectadas; Y= culturas infectadas pelo *T. cruzi*. Os dados são apresentados como a média±desvio padrão de 3 experimentos independentes. * (comparação com NT não infectado); # (comparação com NT infectado). 1 símbolo: $p < 0,05$; 2 símbolos: $p < 0,01$; 3 símbolos: $p < 0,001$. One-way ANOVA. Pós-teste: Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

A fibrose é uma importante manifestação clínica da CCC (Rassi Jr *et al.*, 2012) e apesar do reconhecido envolvimento de fibroblastos na gênese da fibrose em diferentes doenças (Wick *et al.*, 2013), inclusive cardiovasculares (Porter & Turner, 2009; Vasquez *et al.*, 2011), o papel dos FCs na fibrose na CCC é pouco estudado. No presente estudo investigamos o efeito da infecção pelo *T. cruzi* e do TNF sobre a ativação de FCs *in vitro*, visando compreender o papel de FCs ativados no processo de gênese da fibrose cardíaca na infecção chagásica. Nossos principais achados indicam que a infecção pelo *T. cruzi* ativa os FCs através da indução de diferenciação celular e expressão de proteínas de ECM. Além disso, nossos dados também mostram que a citocina inflamatória TNF, apesar de não estimular diferenciação e síntese de ECM pelos FCs, influencia o processo de proliferação destas células, outro importante parâmetro de ativação celular, além de reduzir a infecção dos FCs pelo *T. cruzi*.

Iniciamos nosso estudo caracterizando os nossos cultivos de FCs, uma vez que estas células foram obtidas a partir do cultivo primário de células cardíacas que é rico em cardiomiócitos (Meirelles *et al.*, 1986). Nesse sentido, realizamos análises morfológicas, funcionais e bioquímicas. Nossos resultados demonstraram que os FCs, cultivados em monocamada, preservam as características morfológicas do fibroblasto no tecido (Gartner & Hiatt, 2007) e *in vitro* (Goldsmith *et al.*, 2004; Camelliti *et al.*, 2005), apresentando-se como células grandes com formato fusiforme, citoplasma emitindo prolongamentos, núcleo oval e grande com nucléolos evidentes.

Em seguida, através da técnica de *Western Blotting*, verificamos que a partir da primeira passagem (p.01) já não havia a presença de células musculares cardíacas na cultura, uma vez que não observamos a expressão de tropomiosina sarcomérica (TS), um marcador específico de células musculares estriadas (Perry, 2001). Desta forma, na primeira passagem já tínhamos um cultivo enriquecido em FCs, porém, por uma questão de segurança, definimos realizar os nossos experimentos a partir da segunda passagem (p.02). Na p.02 nossos dados de imunofluorescência, revelaram alto índice de enriquecimento de FCs (>95% de células negativas para TS) nas culturas. Demonstramos ainda nas nossas culturas a presença do receptor de domínio de discoidina 2 (DDR2), um receptor de colágeno

sugerido como marcador específico de FCs (Goldsmith *et al.* 2004). Assim, nossos resultados estão de acordo com dados da literatura que caracterizaram cultivos de FCs murinos (Couture *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2013).

Observamos que os FCs também conservaram características funcionais típicas desse tipo celular tais como, capacidade de se diferenciar para miofibroblasto (Asazuma-Nakamura *et al.*, 2009), revelada pela expressão de α -SMA e capacidade de produzir proteínas de ECM (Baudino *et al.*, 2006), demonstrada pela expressão de laminina e fibronectina, em diferentes tempos de cultivo.

Após a caracterização dos nossos cultivos, estabelecemos a infecção dos FCs pelo *T. cruzi* de acordo com protocolos prévios do nosso grupo já publicados com células cardíacas (Meirelles *et al.*, 1986). Observamos que FCs obtidos de camundongos Swiss Webster, quando infectados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* (MOI de 10), apresentaram uma taxa de infecção em torno de 40%, quando os parasitas não aderidos foram removidos com 24h de interação. Esta taxa está de acordo com dados prévios do nosso grupo em culturas primárias de células cardíacas, em que foi demonstrada uma taxa de infecção em torno de 40% dos FCs e 20% dos cardiomiócitos, quando o mesmo protocolo de infecção foi utilizado (Araújo-Jorge *et al.*, 1992). A literatura mostra que a taxa de infecção *in vitro* pelo *T. cruzi* é dependente do modelo de interação parasita-célula hospedeira utilizado (De Araújo-Jorge *et al.*, 1992; Calvet *et al.*, 2004; Garzoni *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2003). Por exemplo, de Souza e colaboradores (2003), demonstraram que utilizando-se um MOI de 20 formas tripomastigotas de DM28c, a infecção de fibroblastos de pele e de músculo esquelético obtidos a partir de cultivo primário chegou a aproximadamente 70% (de Souza *et al.*, 2003). Esses dados demonstram que fibroblastos de diferentes origens teciduais são altamente susceptíveis a infecção *in vitro* pelo *T. cruzi* (Araújo-Jorge *et al.*, 1992; de Souza *et al.*, 2003).

Os fibroblastos são células que compõem o tecido conjuntivo nos diferentes órgãos (Vasquez *et al.*, 2011) e os principais responsáveis pela síntese de componentes da ECM (Porter & Turner, 2009). Apesar dos cardiomiócitos contribuírem mais para o volume do coração, os FCs encontram-se em maior número (Jugdutt, 2003) e são responsáveis pelos processos de cicatrização e fibrose, principalmente relacionados a infarto do miocárdio, hipertensão e insuficiência cardíaca (Porter & Turner, 2009; Vasquez *et al.*, 2011). Andrade e colaboradores (1986) reportaram a associação dos FCs com a fibrose na CCC em

modelo experimental, demonstrando a presença de células do sistema imune, fibroblastos e miofibroblastos associadas com depósitos de colágeno.

A participação dos fibroblastos na fibrose ocorre em situação de dano tecidual em que há necessidade de reparo (Baudino *et al.*, 2006). A persistência ou intensidade do estímulo pró-fibrogênico resulta na manutenção de um fenótipo ativado e no depósito aumentado de proteínas de ECM por estas células, o que pode levar a alterações elétricas e, mais tardiamente, à disfunção cardíaca (Gurtner *et al.*, 2008; Asazuma-Nakamura *et al.*, 2009; Wynn & Ramalingam, 2012). A ativação dos fibroblastos é caracterizada entre outros processos, pelo aumento da proliferação, diferenciação em miofibroblastos, através da expressão de α -SMA e produção aumentada de proteínas de ECM (Baudino *et al.*, 2006).

No presente estudo, avaliamos a capacidade do *T. cruzi* em ativar FCs. Demonstramos que a infecção pelo *T. cruzi* foi capaz de induzir aumento da expressão de α -SMA nos tempos iniciais de infecção (6h e 24h) corroborando dados do nosso grupo que demonstraram que a infecção aguda pelo *T. cruzi* induz aumento da expressão de α -SMA no coração (Nisimura LM, - dados não publicados), além de dados de um grupo da argentina que demonstrou em modelo murino de infecção crônica aumento da expressão de α -SMA no tecido cardíaco (Ferrer *et al.*, 2013). Nossos dados demonstraram que a partir de 48h de infecção houve diminuição da expressão de α -SMA, sugerindo quebra dos filamentos de actina nos miofibroblastos cardíacos nos tempos finais de infecção, como observado anteriormente em cardiomiócitos quando diferentes proteínas de citoesqueleto foram avaliadas, revelando desorganização de miofibrilas (Pereira *et al.*, 1993; Taniwaki *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2006). Pereira e colaboradores (2000) demonstraram ainda que a infecção pelo *T. cruzi* regulou de forma diferenciada os níveis de mRNA de β e α -actina cardíaca nos tempos finais de infecção, uma vez que após 48h de infecção houve aumento da expressão gênica de β -actina enquanto que após 72h de infecção os níveis de mRNA de α -actina cardíaca diminuíram (Pereira *et al.*, 2000). Nossos resultados de imunofluorescência para α -SMA no tempo de 72h de infecção também revelaram um padrão alterado de distribuição dos filamentos desta proteína quando comparado com as culturas de FCs não infectadas além de perda de marcação, confirmando os nossos dados de *Western Blotting*. Nesse sentido, nossos achados demonstram que a infecção pelo parasita ativa FCs nos tempos iniciais de infecção e que nos tempos finais poderia estar havendo quebra do citoesqueleto e consequente perda da marcação, dificultando assim a avaliação da

ativação utilizando-se como parâmetro a análise de α -SMA. Desta forma, avaliamos um outro parâmetro de ativação, a expressão de proteínas de ECM.

Estudos *in vivo* em diferentes modelos de infecção pelo *T. cruzi* demonstraram aumento de deposição de laminina e/ou fibronectina no coração de camundongos (Andrade *et al.*, 1989; Calvet *et al.*, 2004; Marino *et al.*, 2004; Olivieri *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014b). Além disso, estudos em humanos demonstraram níveis aumentados de fibronectina no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, associados a elevados níveis de ativação da via de TGF- β (Araújo-Jorge *et al.*, 2002, Waghbi *et al.*, 2009). De modo importante, alterações elétricas foram diretamente correlacionadas à presença de fibrose cardíaca e ao pior prognóstico dos portadores crônicos da DC (Strauss *et al.*, 2011).

A co-localização de alta frequência de antígenos ou material genômico do *T. cruzi* com infiltrados inflamatórios e regiões com fibrose no tecido cardíaco já é bem reportada na literatura (Andrade & Grimaud, 1986; Andrade *et al.*, 1989; Marin-Neto *et al.*, 2007). Contudo, no nosso estudo demonstramos que a infecção pelo *T. cruzi*, na ausência de células inflamatórias, foi capaz de ativar FCs através da indução de expressão das proteínas de ECM fibronectina e laminina nestas células. Observamos aumento na expressão de laminina nos tempos iniciais de infecção (6h e 24h pós-infecção) e fibronectina nos tempos de 6, 24 e 48 horas pós-infecção. O papel do *T. cruzi* de maneira independente da presença de células inflamatórias na indução de proteínas de ECM já foi demonstrado em estudos *in vitro* em culturas de células de mamíferos de diferentes origens teciduais. Pinho e colaboradores (2002) demonstraram que antígenos solúveis de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cisteíno proteinase - gp51 - e *trans*-sialidase) foram capazes de induzir após 20h de interação, aumento na expressão de fibronectina e laminina em células musculares esqueléticas (C2C12) e fibroblastos de tecido adiposo (L929), que também apresentaram aumento na expressão de colágeno do tipo I. Nosso grupo demonstrou que a infecção pelo *T. cruzi* induziu fibrose no modelo de cultivo primário de células cardíacas em 3D (microtecidos cardíacos) através do aumento na expressão de fibronectina, laminina e colágeno IV, independente da presença de células do sistema imune, após longos períodos de infecção (144h) (Garzoni *et al.*, 2008). Porém, quando cultivos primários de cardiomiócitos em monocamadas foram infectados pelo *T. cruzi* por 72h, houve diminuição dos níveis de fibronectina (Calvet *et al.*, 2004). O mesmo foi observado em cultivos de fibroblastos de pele após 24h de infecção (Unnikrishnan & Burleigh, 2004). Nossos dados também revelaram

redução na expressão desta proteína nos FCs após 72h de infecção pelo *T. cruzi*, corroborando os dados de Calvet e colaboradores (2004). No entanto como mencionado acima, no tempo de 24h de infecção observamos aumento nos níveis de fibronectina, ao contrário do que foi observado por Unnikrishnan & Burleigh (2004). Sendo assim, estas diferenças nos resultados obtidos pelos diferentes grupos, incluindo o nosso, em relação à expressão de fibronectina, podem ser consequência não apenas do tempo de interação parasita-célula hospedeira mas também do modelo experimental utilizado. Além disso, devemos considerar a funcionalidade dos FCs no tempo de 72h de infecção. Como mencionado anteriormente, estudos *in vitro* com cardiomiócitos em monocamada mostraram que o parasita induz desorganização e quebra do citoesqueleto nos tempos finais de infecção (Pereira *et al.*, 1993; Taniwaki *et al.*, 2006). Foi demonstrado que estas alterações no citoesqueleto interferem no influxo de cálcio e prejudicam a contratilidade da célula cardíaca (Pereira *et al.*, 1993; Taniwaki *et al.*, 2006). Da mesma forma, tem sido relatada redução na expressão de conexina 43, proteína de junção celular importante para funcionalidade cardíaca, em cardiomiócitos infectados pelo parasita após 72h de infecção (Adesse *et al.*, 2008).

A associação da inflamação com a fibrose na cardiomiopatia chagásica está bem estabelecida (Laranja *et al.*, 1956; Andrade *et al.*, 1986; Reis *et al.*, 1993; Garg *et al.*, 2003; Araújo-Jorge *et al.*, 2012). Na infecção aguda, citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF atuam no controle do parasita através da indução da produção de NO (Junqueira *et al.*, 2010). Além disso, altas concentrações séricas de TNF foram detectadas no soro de pacientes com a forma cardíaca grave da DC (Pérez *et al.*, 2011) e em modelos experimentais de infecção crônica pelo *T. cruzi* que foram correlacionadas com fibrose e disfunção cardíaca (Pereira *et al.*, 2014b). O TNF é uma das principais citocinas envolvidas no processo de ativação de FCs em doenças cardiovasculares como hipertensão, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Porter & Turner, 2009; Vasquez *et al.*, 2011; Wynn & Ramalingam, 2012) e levantamos a hipótese de que esta citocina poderia estar envolvida na ativação de FCs durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Inicialmente avaliamos através de ELISA do sobrenadante das culturas o efeito dose resposta do TNF sobre os FCs não infectados e infectados pelo *T. cruzi* na produção desta citocina. Pré-tratamos os FCs 2h antes da infecção com diferentes concentrações de TNF, que foram mantidas até 24h pós-infecção de acordo com o protocolo estabelecido pelo nosso grupo em um estudo com astrócitos

(Silva *et al.*, 2015). Apesar dos FCs serem uma das principais fontes de TNF no tecido cardíaco (Yokoyama *et al.*, 1999; Shames *et al.*, 2002) nossas análises demonstraram que no sobrenadante das culturas não infectadas ou infectadas pelo *T. cruzi* e não tratadas com a citocina, as concentrações de TNF não foram detectáveis. O tratamento com TNF resultou em concentrações detectáveis, porém menores que as concentrações adicionadas da citocina tanto nas culturas não infectadas como infectadas, sugerindo que o TNF pode estar sendo consumido e/ou degradado.

Nosso grupo demonstrou recentemente que a cepa Colombiana do *T. cruzi* foi capaz de induzir aumento na expressão gênica e na secreção de TNF em cultivo primário de astrócitos obtidos a partir de camundongos C57BL/6. No entanto, neste estudo observou-se que o tratamento resultou em maior quantidade da citocina no sobrenadante das culturas não infectadas do que nas culturas infectadas com 24h, sugerindo um mecanismo de consumo de TNF durante a infecção. De fato, foi detectado aumento na expressão do receptor 1 de TNF nos astrócitos infectados o que pode explicar este resultado (Silva RR, - dados não publicados). Aumento na expressão gênica de TNF também foi detectado em culturas primárias de cardiomiócitos obtidas de camundongos BALB/c já com 12h de infecção pelo parasita (Machado *et al.*, 2000). Desta maneira, como perspectiva faremos a análise da expressão gênica de TNF e do seu receptor nas culturas de FCs nas diferentes condições experimentais do nosso estudo na tentativa de elucidarmos os mecanismos envolvidos na diminuição das concentrações de TNF em relação às concentrações adicionadas. Ou seja, se haveria menor produção de TNF, maior consumo da citocina, ou ambos.

Estudos têm demonstrado que as citocinas TNF, TGF- β , IL-1 β e IL-6 estimulam a produção de ROS no tecido cardíaco, bem como são estimuladas pelos mesmos (Nian *et al.*, 2004). Evidências sugerem que ROS podem servir como moléculas sinalizadoras, ativando ERK1/2 e a produção de TGF- β , contribuindo assim para a proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (Thannickal & Fanburg, 2000). Concentrações elevadas de NO estão associadas a concentrações aumentadas de TNF no soro de pacientes e animais cronicamente infectados e foram correlacionadas com a gravidade da CCC (Pérez-Fuentes *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012), incluindo fibrose (Pereira *et al.*, 2014b). Neste contexto nos perguntamos se o TNF poderia ter alguma influência na produção de NO pelos FCs não infectados e infectados pelo *T. cruzi*. Avaliamos a

produção de NO nos sobrenadantes de FCs através do método de Griess. Nas nossas condições experimentais, não detectamos NOx em sobrenadantes de FCs, seja quando estimulados somente com *T. cruzi* ou TNF, ou mesmo utilizando-se os dois estímulos ao mesmo tempo. Já foi demonstrado que o TNF produzido pelos próprios macrófagos durante infecção pelo *T. cruzi* é capaz de estimular de maneira autócrina a produção de NO por estas células, agindo em sinergia com IFN- γ (Silva *et al.*, 1995). Machado e colaboradores (2000) através da avaliação da cinética de produção de NOx em cardiomiócitos infectados e posteriormente tratados com TNF, assim como nós, não observaram efeito na produção de NOx após 24h de infecção. No entanto, eles observaram aumento de NOx após 120h de infecção, demonstrando um efeito tardio na produção desse mediador inflamatório. Contudo, ao se adicionar outras citocinas juntamente com o TNF (IFN- γ e IL-1 β), já a partir de 24h de infecção foi possível observar aumento nos níveis de nitrito no sobrenadante dos cardiomiócitos (Machado *et al.*, 2000). É possível que nos FCs, a presença de outras citocinas pró-inflamatórias seja necessária para estimular juntamente com TNF a produção de NO em tempos iniciais de infecção. Desde modo, futuramente pretendemos avaliar a produção de NO pelos FCs em tempos iniciais e finais de infecção, na presença de outras citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TGF- β).

Nossas análises do efeito do TNF sobre a infecção dos FCs pelo *T. cruzi* demonstraram que o tratamento prévio com a citocina, mantida durante o período de infecção (24h) em três concentrações (0,1, 3 e 30 ng/mL) reduziu o número de células infectadas, sendo que a concentração mais baixa apresentou um efeito mais pronunciado. Além disso, a concentração de 0,1 ng/mL reduziu o número de parasitas intracelulares, o que não foi observado com as outras concentrações, sugerindo que diferentes concentrações de TNF podem ter efeitos distintos sobre a infecção. Estes resultados sugerem que o TNF pode estar apresentando nos FCs um efeito microbicida já descrito previamente em macrófagos (Silva *et al.*, 1995) e em cardiomiócitos (Machado *et al.*, 2000).

Dados da literatura demonstram que o TNF está envolvido na ativação de FCs, através da regulação de diferentes processos, como proliferação, diferenciação celular, migração, secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β e IL-6) e regulação de componentes de ECM, incluindo MMPs e TIMPs (Porter *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2007; Porter & Turner, 2009). Nesse sentido, iniciamos nossos estudos avaliando o efeito do TNF sobre a ativação dos FCs infectados e não infectados, através da análise de diferenciação em miofibroblastos (expressão de α -SMA) e

expressão de proteínas de ECM (fibronectina e laminina), por *Western Blotting*. Nossos resultados revelaram que o tratamento prévio com TNF não interferiu na diferenciação de FCs em miofibroblastos, uma vez que não alterou os níveis de α -SMA, tanto nas culturas infectadas quanto não infectadas. TNF também não influenciou na expressão de laminina e de fibronectina pelos FCs, mesmo durante a infecção pelo *T. cruzi*. Desta forma, decidimos avaliar um outro parâmetro de ativação, a proliferação (Baudino *et al.*, 2006). Para tal, realizamos a imunofluorescência para ki-67, marcador de proliferação celular (Zcholzhen & Gerdes, 2000). A adição de 3 ng/mL de TNF às culturas não infectadas induziu proliferação dos FCs enquanto que as outras concentrações utilizadas não tiveram efeito sobre estas células (0,1 e 30 ng/mL). O *T. cruzi* não foi capaz de induzir a proliferação dos FCs no tempo de 24h, mas de modo interessante, quando os FCs foram submetidos aos dois estímulos ao mesmo tempo, TNF e *T. cruzi*, houve aumento da proliferação nas três concentrações da citocina utilizadas (0,1, 3 e 30 ng/mL), sendo este efeito mais pronunciado nas concentrações mais altas. Assim, nossos resultados demonstraram que apesar de apenas a infecção pelo *T. cruzi* não interferir na proliferação de FCs, ela parece contribuir com o TNF na indução de proliferação nestas células. Além disso, mais uma vez, as diferentes concentrações de TNF parecem exercer efeitos distintos.

Fazendo um paralelo dos nossos dados com o que ocorre nas formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas crônica, em que observa-se maiores concentrações de TNF no soro dos pacientes conforme o aumento da gravidade da CCC (Pérez *et al.*, 2011), podemos sugerir que estas altas concentrações de TNF podem levar ao aumento da proliferação de fibroblastos cardíacos contribuindo não apenas para um maior número de células que podem albergar o *T. cruzi* no coração, mas também para a síntese de proteínas de ECM e gênese da fibrose cardíaca. Visto que, estas células são refratárias à morte por apoptose induzida pela infecção pelo *T. cruzi* até o tempo de 96h de infecção (de Souza *et al.*, 2003).

TGF- β é uma outra citocina envolvida na ativação de FCs (Wynn & Ramalingan, 2012) e que tem sido associada com a fibrose cardíaca na doença de Chagas (Araújo-Jorge *et al.*, 2012). O TNF induz a produção de TGF- β em fibroblastos de diferentes origens teciduais (Liew *et al.*, 2013), sendo assim é possível que o efeito do TNF na indução de proliferação dos FCs observado no presente estudo, seja devido ao efeito desta citocina na indução de TGF- β nestas

células, o que futuramente iremos avaliar através de uma cinética de produção de TGF- β pelos FCs, durante tratamento com TNF. Mais ainda, o TNF pode estar induzindo outros processos envolvidos na ativação dos FCs que nós não avaliamos. Entre eles podemos citar a migração celular, regulação de MMPs e TIMPs e secreção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-1 β (Baudino *et al.*, 2006; Porter & Turner, 2009).

O fato de não termos observado alteração na expressão de laminina e fibronectina durante o tratamento das culturas com TNF, mas termos observado o efeito da citocina sobre a infecção e a proliferação de FCs sugere uma ação sobre diferentes processos em um mesmo período de tempo do estímulo. Desta forma, a ação desta citocina sobre os FCs pode ser dependente não apenas da concentração, mas também do tempo de estímulo, o que demonstra a necessidade de um estudo do efeito do TNF em diferentes tempos de infecção e de tratamento nestas células. Grotendorst e colaboradores (2004) demonstraram através de um estudo do efeito de TGF- β sobre a ativação de fibroblastos renais que as respostas a citocina são mutuamente exclusivas quanto a proliferação e diferenciação, ou seja, células que estão proliferando não expressam α -SMA e nem proteínas de ECM e células que estão diferenciando e sintetizando proteínas de ECM não estão proliferando. Além disso, os autores demonstraram que a proliferação e diferenciação dos fibroblastos renais são controladas pela combinação de diferentes vias de sinalização.

Estudos recentes do nosso grupo têm demonstrado que a terapia com o imunomodulador pentoxifilina reduz a fibrose cardíaca e a expressão dos receptores 1 e 2 de TNF em linfócitos T CD8⁺ no modelo murino de doença de Chagas crônica, além de melhorar a função cardíaca (Pereira *et al.*, 2015). Nosso grupo demonstrou ainda que o anticorpo anti-TNF (infiximab) foi capaz de reduzir as concentrações de TNF no soro de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e a expressão gênica desta citocina no tecido cardíaco, além de reduzir a fibrose cardíaca e melhorar a função do coração (Pereira *et al.*, 2014a).

Nosso estudo demonstrou que o *T. cruzi* bem como a citocina pró-inflamatória TNF, são capazes de ativar os fibroblastos cardíacos, possivelmente contribuindo para a gênese da fibrose cardíaca na doença de Chagas. Portanto, a utilização de estratégias terapêuticas que inibam a ativação destas células seja através de ação tripanossomicida ou do bloqueio da ação de citocinas como o TNF, possivelmente

irá contribuir para a diminuição da fibrose cardíaca e a melhora do prognóstico dos pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica.

6. CONCLUSÕES

- 1) Demonstramos que *in vitro*, de acordo com o protocolo utilizado em nosso estudo, foi possível obter um cultivo rico em fibroblastos cardíacos como caracterizado pela perda de tropomiosina sarcomérica, um marcador de células musculares estriadas e pela presença de DDR2, um receptor de colágeno que vem sendo considerado um marcador específico de fibroblastos cardíacos. Além disso, as células em cultura apresentam características morfológicas típicas de fibroblastos tais como, formato fusiforme, núcleo oval e grande entre outras.
- 2) Os fibroblastos cardíacos são capazes de expressar fibronectina, laminina e α -SMA, demonstrando a funcionalidade destas células em cultura através da produção de proteínas de matriz extracelular e da capacidade de diferenciação em miofibroblastos.
- 3) Confirmamos dados previamente reportados na literatura, demonstrando que fibroblastos cardíacos são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* (cepa Y), e que o parasita é capaz de completar o seu ciclo intracelular nestas células.
- 4) A infecção pelo *T. cruzi* mesmo na ausência de células do sistema imune é capaz de ativar fibroblastos cardíacos *in vitro* através da indução de diferenciação destas células em miofibroblastos, como demonstrado através do aumento de expressão de α -SMA, e aumento da produção de proteínas de matriz extracelular como fibronectina e laminina.

- 5) A infecção pelo *T. cruzi* no tempo de 24h não induz em fibroblastos cardíacos a produção de TNF e de NO nem mesmo quando as células hospedeiras são estimuladas com TNF.

- 6) O TNF reduz a infecção pelo *T. cruzi* quando as culturas são pré-tratadas e a citocina é mantida durante o tempo de interação com o parasita utilizado neste estudo (24h). Este efeito foi mais expressivo na menor dose utilizada (0,1 ng/mL).

- 7) O tratamento com TNF tanto nas culturas infectadas como não infectadas, não induz a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos e nem a expressão de fibronectina e laminina nestas células, porém induz proliferação celular que é um importante parâmetro de ativação. A infecção pelo *T. cruzi* em sinergia com TNF favorece a proliferação dos fibroblastos cardíacos, apesar do parasita na ausência desta citocina não induzir a proliferação dessas células.

- 8) Nossos dados demonstram que o *T. cruzi* bem como a citocina pró-inflamatória TNF, são capazes de ativar os fibroblastos cardíacos, possivelmente contribuindo para a gênese da fibrose cardíaca na doença de Chagas.

7. PERSPECTIVAS

Avaliar o efeito do *T. cruzi* sobre a proliferação de FCs através de um estudo cinético de infecção (6h – 72h).

Realizar imunofluorescência para α -HSM, fibronectina e laminina durante cinética de 6h-72h de infecção pelo *T. cruzi*.

Analisar a expressão gênica de TNF e do seu receptor nas culturas de FCs nas diferentes condições experimentais do nosso estudo, na tentativa de elucidarmos os mecanismos que levaram a redução das concentrações de TNF nos sobrenadantes de FCs em relação às concentrações exógenas adicionadas.

Avaliar a produção de NO pelos FCs em tempos iniciais e finais de infecção, na presença de outras citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TGF- β).

Realizar estudo cinético da produção de TGF- β pelos FCs, durante tratamento com TNF.

Avaliar o efeito do TNF sobre a ativação e infecção de fibroblastos cardíacos em diferentes tempos de infecção e tratamento, através de WB e imunofluorescência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Adesse D, Azzam EM, Meirelles Mde N, Urbina JA, Garzoni LR. Amiodarone inhibits *Trypanosoma cruzi* infection and promotes cardiac cell recovery with gap junction and cytoskeleton reassembly in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(1):203-10, 2011.

Anavekar NS & Solomon SD. Angiotensin II receptor blockade and ventricular remodelling. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 6:43–48, 2005.

Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(7):e3010, 2014.

Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, *et al.* I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol.* 96:434–42, 2011.

Andrade SG & Grimaud JA. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* - an ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81:29-41, 1986.

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.* 40(3):252-60, 1989.

Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 86:187-200, 1991.

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

Araújo-Jorge TC, Waghabi MC, Bailly S, Feige JJ. The TGF- β pathway as an emerging target for Chagas disease therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 92(5):613-21, 2012.

Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF- β signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res.* 315 (7):1190-9, 2009.

Bai J, Zhang N, Hua Y, Wang B, Ling L, Ferro A, Xu B. Metformin inhibits angiotensin II-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *PLoS One.* 8(9):e72120, 2013.

Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:1883-1891, 2007.

Ben Younès-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Said G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82(1):77-83, 1988.

Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res.* 65:657-670, 1989.

Bing OH, Ngo HQ, Humphries DE, Robinson KG, Lucey EC, Carver W, Brooks WW, Conrad C H, Hayes JA, Goldstein R H. Localization of alpha1(I) collagen mRNA in myocardium from the spontaneously hypertensive rat during the transition from compensated hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 29:2335-2344. 1997.

Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res.* (1):27-44, 1999.

Borda EP, Cossio P, Veja MV, Arana R, Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas disease which binds to α_1 -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. Clin Exp Immunol. 57:679–686, 1984.

Border WA1, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med. 331(19):1286-92,1994.

Brown RD, Jones GM, Laird RE, Hudson P, Long CS. Cytokines regulate matrix metalloproteinases and migration in cardiac fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 362:200–205, 2007.

Brown E & Dejana E. Cell-to-cell contract and the extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol. 15:505–508, 2003.

Bujak M & Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. Cardiovasc Res. 74:184–195, 2007.

Calvet C, Meuser M, Almeida D, Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. Exp Parasitol. 107(1-2):20-30, 2004.

Campbell S & Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. J Mol Cell Cardiol. (7):1947-58,1997.

Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. Cardiovasc Res. 65:40-51, 2005.

Carvalho CM, Silverio JC, da Silva AA, Pereira IR, Coelho JM, Britto CC, Moreira OC, Marchevsky RS, Xavier SS, Gazzinelli RT, Bonecini-Almeida MG, Lannes-Vieira J. Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of *Trypanosoma cruzi*-infected rhesus monkeys: association with heart injury. PLoS Negl Trop Dis 6:e1644, 2012.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1:159-218, 1909.

Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 10:276–81, 2011.

Corda S, Samuel JL, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev.* 5:119–130, 2000.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed-a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102:113-22, 2007.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010 115(1-2):5-13, 2010.

Couture P, Paradis-Massie J, Oualha N, Thibault G. Adhesion and transcellular migration of neutrophils and B lymphocytes on fibroblasts. *Exp Cell Res.* 315(13):2192-206, 2009.

Cowling RT, Zhang X, Reese VC, Iwata M, Gurantz D, Dillmann WH, Greenberg B. H. Effects of cytokine treatment on angiotensin II type 1A receptor transcription and splicing in rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H1176–H1183, 2005.

De Araujo-Jorge TC1, Barbosa HS, Meirelles MN. Trypanosoma cruzi recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87 Suppl 5:43-56, 1992.

de Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige JJ, Bailly S, Waghbi MC. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(6):e1696, 2012.

de Souza EM, Araújo-Jorge TC, Bailly C, Lansiaux A, Batista MM, Oliveira GM, Soeiro MN. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res.* 314(2):223-35, 2003.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8(4):269-85, 2002.

Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology.* 146:56–66, 1995.

Diniz Lde F, Urbina JA, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TA, Caldas IS, Talvani A, Ribeiro I, Bahia MT. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis.* 15;7(8):e2367, 2013.

Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Ambruster FP, Baumann G, Stangl K. The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J.* 15:2187–2195, 2001.

Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol.* 87:183– 9. 1992.

Fernandes MC & Andrews NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Rev.* 36(3):734-47, 2012.

Fernando L, Pamela S, Alejandra L. Cardiovascular disease in Latin America: the growing epidemic. *Prog Cardiovasc Dis.* 57(3):262-7, 2014.

Ferrer MF, Pascuale CA, Gomez RM, Leguizamón MS. DTU I isolates of *Trypanosoma cruzi* induce upregulation of Galectin-3 in murine myocarditis and fibrosis. *Parasitology.* 141(6):849-58, 2014.

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.* 49:1521–1528, 2005.

Garg N, Popov VL, Papaconstantinou J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochim Biophys Acta.*1638(2):106-20, 2003.

Gartner, LP & Hiatt, JL. *Tratado de Histologia em cores.* 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 576p.

Garzoni LR1, Caldera A, Meirelles Mde N, de Castro SL, Docampo R, Meints GA, Oldfield E, Urbina JA. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 23(3):273-85, 2004.

Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R, de Meirelles Mde N. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis.* 197 (6):906-15, 2008.

Goldsmith EC, Hoffman A, Morales MO, Potts JD, Price RL, McFadden A, Rice M, Borg TK.. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn.* 230:787–794, 2004.

Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science.* 212:56-58, 1981.

Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J.* 18(3):469-79, 2004.

Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH. IL-1 β and TNF- α upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol.* 38:505–515, 2005.

Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 27:2130–2134, 1993.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker M T. Wound repair and regeneration. *Nature.* 453:314–321, 2008.

Higuchi ML, de Moraes CF, Barreto ACP, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 10:665-670, 1987.

Higuchi ML, Brito T, Reis MM, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol.* 2:101–106, 1993.

Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 60(1):96-107, 2003.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 170:1807–1816, 2007.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, *et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 112(12):e154-235, 2005.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am TropMed Hyg.* 48:348–357, 1993.

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation.*108:1395–1403, 2003.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 12:e29, 2010.

Kanekar S, Hirozanne T, Terracio L, Borg TK. Cardiac fibroblasts form and function. *Cardiovasc Pathol.* 7(3):127-33, 1998.

Kierszenbaum F. Auto-imunidade na doença de Chagas: fato ou fantasia? Causa ou consequência? *Rev Soc Bras Med Tro.* 18:129-132,1985.

Kisseleva T & Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 233(2):109-22, 2008.

Kroll-Palhares K, Silverio JC, da Silva AA, Michailowsky V, Marino AP, Silva NM, Carvalho CME, Pinto LMO, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:375-385, 2008.

Kuruvilla L, Nair RR, Umashankar PR, Lal AV, Kartha CC. Endocardial endothelial cells stimulate proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts. *Cell Biochem Biophys.* 47:65–72, 2007.

Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Soeiro Mde N, Gadelha P, Corrêa-Oliveira R. The centennial of the Discovery of Chagas disease: facing the current challenges. *Plos Negl Trop Dis.* 4:e645, 2010.

Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*. 14:1035–1059, 1956.

Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor- β 1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 448:206–210, 1999.

Li Z & Jimenez SA. Protein kinase C δ and c-Abl kinase are required for transforming growth factor β induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro. *Arthritis Rheum*. 63:2473–83, 2011.

Liew R, Khairunnisa K, Gu Y, Tee N, Yin NO, Naylynn TM, Moe KT. Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Pathogenesis of Atrial Fibrosis and Development of an Arrhythmogenic Substrate. *Circ J*. 77(5):1171-9, 2013.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Collagen production in cardiac fibroblasts during inhibition of angiotensin-converting enzyme and aminopeptidases. *J Hypertens*. 22:209–216, 2004.

Lindner D, Zietsch C, Tank J, Sossalla S, *et al*. Cardiac fibroblast support cardiac inflammation in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 109:428, 2014.

Lotze U, Heinke S, Fritzenwanger M, Krack A, Muller S, Figulla HR. Carvedilol inhibits platelet-derived growth factor-induced signal transduction in human cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:576–589, 2002.

Ma TK, Kam KK, Yan BP, Lam YY. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. *Br J Pharmacol*. 160:1273–1292, 2010.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 102:3003-3008, 2000.

Mahmoud MF, El Shazly SM, Barakat W. Inhibition of TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via NF- κ B dependent pathway. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 385:465-471, 2012.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 115(9):1109-23, 2007.

Marino AP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 110:1443-1449, 2004.

Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem.* 59(1):168-79, 2013.

Meirelles MNL, Souto-Padron T, De Souza W, Participation of cell surface anionic sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. *J Submicrosc. Cytol Pathol.*16:533–545, 1984.

Meirelles MN, de Araujo-Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, Barbosa HS. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol.* 41 (2):198-206, 1986.

Melo TG, Almeida DS, Meirelles MN, Pereira MC. Disarray of sarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 133(Pt 2):171-8, 2006.

Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, *et al.* Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ. Res.* 108:235–48, 2011.

Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS IL-1 β stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292:H1139–H1147, 2007.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, *et al.* Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJMoa1507574.

Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol.* 22(2):301-7, 1992.

Mukherjee S, Belbin TJ, Spray DC, Iacobas DA, Weiss LM, Kitsis RN, Wittner M, Jelicks LA, Scherer PE, Ding A, Tanowitz HB. Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitol Res.*91:187–196, 2003.

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA , *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol.*14(5):634–643, 2012.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 94(12):1543-53, 2004.

Olivieri BP, Molina JT, de Castro SL, Pereira MC, Calvet CM, Urbina JA, Araújo-Jorge TC. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents.* 36(1):79-83, 2010.

Parker ER & Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin.* 29(1):53-62, 2011.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA, Moreira OC, Britto C, Sarmiento EDM, Lannes-Vieira J. Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease. *Mediators Inflamm.* 2014:798078, 2014a.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA, Lannes-Vieira J. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumor necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109:289-298, 2014b.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Moreira OC, Ramos IP, Gibaldi D, Britto C, Moraes MO, Lannes-Vieira J. Pentoxifylline reverses chronic experimental Chagasic cardiomyopathy in association with repositioning of abnormal CD8+ T-cell response. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(3):e0003659, 2015.

Pereira MC, Costa M, Chagas Filho C, de Meirelles MN. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 25(4):559-69, 1993.

Pereira MC, Singer RH, de Meirelles MN. *Trypanosoma cruzi* infection affects actin mRNA regulation in heart muscle cells. *J Eukaryot Microbiol*. 47(3):271-9, 2000.

Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, Bottasso O. Immunoneuroendocrine alteration in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. *J Neuroimmunol*. 235(1-2):84-90, 2011.

Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, Romero-Díaz M, Pulido-Pérez P, Sánchez-Guillén MC. Correlation of the serum concentrations of tumor necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 101:123-132, 2007.

Perry S. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil*. 22(1):5-49, 2001.

Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol*. 32:565-576, 2000.

Pinho RT, Vannier-Santos MA, Alves CR, Marino AP, Castello Branco LR, Lannes-Vieira J. Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. *Acta Trop.* 83(2):103-15, 2002.

Pinto AMT, Sales PCM, Camargos ERS, Silva AM. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF- κ B activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 13:1518-1529, 2011.

Porter KE, Turner NA, O'Regan D J, Ball SG. Tumor necrosis factor α induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin. *Cardiovasc Res.* 64:507–515, 2004.

Porter KE & Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 123 (2):255-78, 2009.

Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther.* 7:R1113–23, 2005.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 375:1388-1402, 2010.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 26:275-291, 2012.

Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48(5):637-44, 1993.

Rosenkranz S. TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 63:423–432, 2004.

Samuel CS1, Unemori EN, Mookerjee I, Bathgate RA, Layfield SL, Mak J, Tregear GW, Du XJ. Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology*. 145(9):4125-33, 2004.

Sánchez-Sancho F, Campillo NE, Páez JA. Chagas disease: progress and new perspectives. *Curr Med Chem*. 17(5):423-52, 2010.

Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res*. 89(12):1111-21, 2001.

Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Wakeno M, *et al*. Metformin prevents progression of heart failure in dogs: role of AMP-activated protein kinase. *Circulation*. 119:2568–2577, 2009.

Sedmera D, Pexieder T, Vuillemin M, Thompson RP, Anderson RH. Developmental patterning of the myocardium. *Anat Rec*. 258(4):319-37, 2000.

Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF- α mRNA and peptide in the myocardium. *Shock*. 17:114–119. 2002.

Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Burstein B, Leung TK, Mitamura H, Ogawa S, Nattel S. Effects of simvastatin on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with congestive heart failure. *Cardiovasc Res*. 74:75–84, 2007.

Scholzen T & Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 182(3):311-22, 2000.

Silva AA, Vilar-Pereira G, Souza AS, Silva RR, Rocha MS, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi*-Induced Central Nervous System Alterations: From the Entry of Inflammatory Cells to Potential Cognitive and Psychiatric Abnormalities. *J Neuroparasitology* 1, 2010.

Silva DT, Meirelles MN, Almeida D, Urbina JA, Pereira MC. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*. 27:530–537, 2006.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun*. 63:4862-4867, 1995.

Silva RR, Mariante RM, Silva AA, dos Santos AL, Roffê E, Santiago H, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 10(2):e0118600, 2015.

Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. CD8⁺ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog*. 8(4):e1002645, 2012.

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res*. 86:1259–1265, 2000.

Strauss DG, Cardoso S, Lima JA, Rochitte CE, Wu KC. ECG scar quantification correlates with cardiac magnetic resonance scar size and prognostic factors in Chagas' disease. *Heart*. 97(5):357-61, 2011.

Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B, Rubin K. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. *Lab Invest*. 74(2):452-66, 1996.

Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, *et al*. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 26:1115–1140, 2005.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 79:215–262, 1999.

Takeda N & Manabe I. Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int J Inflam.* 2011:535241, 2011.

Taniwaki NN, Machado FS, Massensini AR, Mortara RA. *Trypanosoma cruzi* disrupts myofibrillar organization and intracellular calcium levels in mouse neonatal cardiomyocytes. *Cell Tissue Res.* 324:489–496, 2006.

Teixeira, DE, Benchimol M, Crepaldi, PH, de Souza, W. Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ/Consórcio CEDERJ, 2011. 51 p.

Thannickal VJ & Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279:L1005–1028, 2000.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:349-63, 2002.

Tsouli SG, Liberopoulos EN, Goudevenos JA, Mikhailidis, DP, Elisaf MS. Should a statin be prescribed to every patient with heart failure? *Heart Fail Rev.* 13:211–225, 2008.

Turner NA, Porter KE, Smith WH, White HL, Ball SG, Balmforth AJ. Chronic h2-adrenergic receptor stimulation increases proliferation of human cardiac fibroblasts via an autocrine mechanism. *Cardiovasc Res.* 57:784– 92, 2003.

Turner NA, Aley PK, Hall, KT, Warburton P, Galloway S, Midgley L, O'Regan DJ, Wood IC, Ball SG, Porter KE Simvastatin inhibits TNF α -induced invasion of human cardiac myofibroblasts via both MMP-9-dependent and -independent mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 43:168–176, 2007.

Tyler KM & Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 31(5-6):472-81, 2001.

Unnikrishnan M & Burleigh BA. Inhibition of host connective tissue growth factor expression: a novel *Trypanosoma cruzi*-mediated response. *FASEB J.* 18(14):1625-35, 2004.

Urbina JA. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol.* 62(1):149-56, 2015.

Vasquez C, Benamer N, Morley GE. The cardiac fibroblast: functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 57:380–388, 2011.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas” (Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1911, 3:276-294,1911.

Waghbi 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.* 51(8):2905-10, 2007.

Waghbi 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.* 104(8):1083-90, 2009.

Wick G, Grundtman C, Mayerl C, Wimpissinger TF, Feichtinger J, Zelger B, Sgonc R, Wolfram D. The immunology of fibrosis. *Annu Rev Immunol.* 31:107-35, 2013.

World Health Organization (2015) Chagas’ disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.

Wynn TA & Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 18(7):1028–1040, 2012.

Xiao H, Ji AM, Li ZL, Song XD, Su D, Chen AH. Interleukin-1 β inhibits collagen synthesis and promotes its decomposition in cultured cardiac fibroblasts. *Sheng Li Xue Bao.* 60:355–361, 2008.

Xiao H, Ma X, Feng W, Fu Y, Lu Z, *et al.* Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF β 1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res.* 87:504–513, 2010.

Yamada K, Green KG, Sammarel AM, and Saffitz JE. Distinct pathways regulate expression of cardiac electrical and mechanical junction proteins in response to stretch. *Circ Res.* 97:346–353, 2005.

Yin F, Lu ZZ, Han QD, Zhang YY. Expression of β 2-adrenergic receptor and its effect on the proliferation of neonatal rat cardiac fibroblasts. *Sheng Li Xue Bao.* 55:251–254, 2003.

Yin M, van der Horst IC, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, *et al.* Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301:H459–468, 2011.

Yokoyama T, Sekiguchi K, Tanaka, T, Tomaru K, Arai M, Suzuki, T, Nagai R. Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol.* 276:H1968–H1976, 1999.

Yu CM, Tipoe GL, Wing-Hon LK., Lau CP. Effects of combination of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor antagonist on inflammatory cellular infiltration and myocardial interstitial fibrosis after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 38:1207–1215, 2001.

Scholzen T & Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 182(3):311-22, 2000.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104:1051-1054, 2009.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 12:240-253, 2012.