

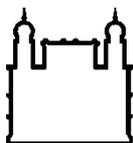
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

PAPEL REGULATÓRIO DO TGF- β NA MATRIZ EXTRACELULAR EM DIVERSOS
TIPOS CELULARES E SEU EFEITO APÓS INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA*
CRUZI.

TATIANA ARAÚJO SILVA

Rio de Janeiro
Março de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TATIANA ARAÚJO SILVA

Papel regulatório do TGF- β na matriz extracelular em diversos tipos celulares e seu efeito após infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dr. Cláudia Magalhães Calvet

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

ii

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

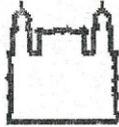
S586 Silva, Tatiana Araújo

Papel regulatório do TGF- β na matriz extracelular em diversos tipos celulares e seu efeito após infecção pelo *Trypanosoma cruzi* / Tatiana Araújo Silva. – Rio de Janeiro, 2015.
xv, 108 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 93-108

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. TGF-beta. 3. Fibrose. 4. Via de sinalização. 5. Fibroblasto cardíaco. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

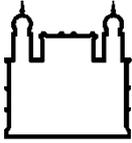
Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Tatiana Araújo Silva**, sob orientação da Dr^a. Cláudia Magalhães Calvet. Ao vigésimo sétimo dia do mês de março de dois mil e quinze, realizou-se às quatorze horas, na Sala A9 do Pavilhão Leônidas Deane, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Papel regulatório do TGF- β na matriz extracelular em diversos tipos celulares e seu efeito após a infecção pelo *Trypanosoma Cruzi***" no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia Celular e Ultra-Estrutura de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Mariana Caldas Waghbi - IOC/Fiocruz (Presidente), Dr. Marcelo Einicker Lamas - UFRJ/RJ, Dr^a. Dea Maria Serra Villa Verde - IOC/Fiocruz e como suplentes: Dr. Fábio de Almeida Mendes - UFRJ/RJ e Dr^a. Suzana Côrte Real Faria - IOC/Fiocruz. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 27 de março de 2015.

Dr^a. Mariana Caldas Waghbi (Presidente da Banca):

Dr. Marcelo Einicker Lamas (Membro da Banca):

Dr^a. Dea Maria Serra Villa Verde (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TATIANA ARAÚJO SILVA

PAPEL REGULATÓRIO DO TGF- β NA MATRIZ EXTRACELULAR EM DIVERSOS TIPOS CELULARES E SEU EFEITO APÓS INFECÇÃO PELO TRYPANOSOMA CRUZI.

ORIENTADORA: Dr. Cláudia Magalhães Calvet

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Mariana Caldas Waghbi – Presidente – (IOC, Fiocruz)

Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas (BIOF, UFRJ)

Prof. Dr. Déa Maria Villa Verde (IOC, Fiocruz)

Prof. Dr. Suzana Corte-Real (IOC, Fiocruz)

Prof. Dr. Fábio de Almeida Mendes (ICB, UFRJ)

Rio de Janeiro, 27 de Março de 2015.

Dedico essa Dissertação à Deus e
minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus.

À minha família que é a base de qualquer realização de um sucesso. Aos meus pais pela compreensão, pelos conselhos, por sempre estar ali com uma palavra de conforto quando precisei. Aos meus irmãos Felipe e Juliana pelas distrações e compreensões nas horas mais precisas.

Em especial a minha orientadora Cláudia Calvet, pelos ensinamentos, pelos conselhos, por sempre acreditar em mim, querer meu crescimento e por ter dado a oportunidade de engatar nesse projeto. Agradeço imensamente pela orientação durante esses dois anos, foram essenciais para meu crescimento e amadurecimento profissional.

À doutora Mirian Pereira por ser uma chefe muito especial que é capaz de tornar o LUC uma segunda família nas nossas vidas.

À banca pela aceitação do convite. Todos os comentários levantados pela banca serão muito relevantes para meu conhecimento e crescimento profissional.

Em especial as minhas grandes amigas Amanda Tucci e Liliane Mesquita que são para mim como irmãs. Desde a minha iniciação científica essas pessoas estão comigo. O companheirismo e a amizade são palavras que definem essas pessoas. Agradeço à Amanda por ter estudado comigo para a chamada de seleção do mestrado. Nosso estudo acrescentou mais conhecimentos, trocamos informações e conseguimos passar para o mestrado. Agradeço também por sempre ter me ajudado no laboratório quando eu mais precisei principalmente quando estava cheia de experimentos e ficava enrolada. Amanda e Liliane sempre me socorreram nas horas mais corridas. São pessoas extremamente especiais que vou levar para sempre na minha vida independente de estarmos ou não no laboratório.

Aos meus amigos do laboratório, Alanderson Nogueira, Carolina Montenegro, Dayse Teixeira, Eveline Antunes, Francisco Oliveira, Guilherme Lechuga, Lorraine Martins, Luciana Pesca, Renata Soares, Tatiana Galvão e aqueles que não estão mais presentes no laboratório Caroline Pereira, Fabrício Halfeld, Laura Coelho e LÍndice Mitie pela amizade de todos vocês, pelas risadas, pela companhia na hora do almoço, por tudo.

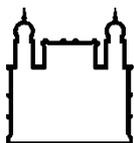
Aos meus colegas de turma da pós-graduação em biologia parasitária. Nossa turma foi muito unida nas disciplinas, um sempre ajudando o outro nos estudos para as provas e os seminários. Foi uma turma em que ganhei muitas amizades.

A pós-graduação Biologia Parasitária pela ajuda de custo nos congressos que participei com passagens aéreas e diárias, proporcionando minha participação em eventos científicos, garantindo sempre o meu crescimento com conhecimentos obtidos através de palestras, conferências e apresentação de postêres. Agradeço também os anticorpos que foram comprados pela pós-graduação para realização do meu projeto.

Agradeço as agências de fomento FIOCRUZ, CAPES, CNPQ e PAPES V pelo custeio do projeto e pela bolsa de mestrado.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charlie Chaplin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

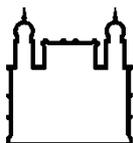
PAPEL REGULATÓRIO DO TGF- β NA MATRIZ EXTRACELULAR EM DIVERSOS TIPOS CELULARES E SEU EFEITO APÓS INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Tatiana Araújo Silva

As manifestações mais severas da doença de Chagas são a cardiomiopatia e fibrose cardíaca, mas o tecido muscular esquelético também é afetado pela infecção pelo *T. cruzi*, resultando em necrose e miosite. O acúmulo de matriz extracelular (MEC) durante o processo de fibrose está envolvido com a patogenia da doença de Chagas, mas seus mecanismos de regulação durante a infecção ainda não estão elucidados. Assim, nos propomos a comparar a resposta de cardiomiócitos (CM), fibroblastos cardíacos (FC) e mioblastos esqueléticos (L6E9) infectados pelo *T. cruzi* frente ao estímulo de TGF- β , importante citocina fibrogênica envolvida no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica, analisando também os mecanismos de sinalização envolvidos neste processo. FC foram purificados a partir de culturas de CM. Purificação adequada de FC foi obtida somente a partir da 5ª dissociação de culturas de CM, revelada pela baixa detecção de desmina, proteína específica de cardiomiócitos. Culturas de CM, FC e L6E9 normais e infectados pelo *T. cruzi* (cepa Y) foram tratadas por 1h ou 48h com TGF- β (1-10 ng/ml). A expressão de FN, SMAD 2 fosforilada (PS2), fosfo-p38 e fosfo-c-Jun foram avaliadas por *Western blot* (WB) após 1h e 48h de tratamento com TGF- β (1-10 ng/ml). Análises de WB revelaram que mioblastos L6E9 e FC apresentam aumento de FN já a partir de 1ng/ml de TGF- β , em contraste com CM, em que só foi observado aumento de MEC com 15ng/mL. A infecção pelo *T. cruzi* induziu uma diminuição da expressão deste componente de MEC em L6E9. FC, por sua vez, apresentam modulação de FN de acordo com o grau de infecção da cultura, com culturas com baixo grau de infecção apresentando redução de FN e culturas altamente infectadas mostrando aumento desta proteína de MEC. A distribuição de fibronectina (FN) também foi analisada por imunofluorescência indireta. FC e L6E9 apresentaram um aumento na expressão de FN a partir de 1ng/ml de TGF- β , confirmando o WB. Após infecção pelo *T. cruzi*, foi observada uma desorganização e redução na expressão de FN em CM, FC e L6E9 infectados, enquanto células não infectadas adjacentes apresentaram perfis de FN similares ao controle. A resposta diferencial entre os tipos celulares frente ao estímulo com TGF- β resulta de mecanismos distintos de sinalização intracelular, uma vez que FC e L6E9 apresentam maior disparo da via de SMADs que CM, enquanto a via de p38 (independente de SMADs) é menos estimulada em FC quando comparados com CM e L6E9. Também foi avaliado o perfil de expressão de proteínas das vias de sinalização clássica e alternativa do TGF- β em culturas de FC normais e infectados com *T. cruzi* e tratados com 10ng/ml da citocina. Culturas infectadas e tratadas com TGF- β (10ng/ml) apresentaram uma redução nos níveis de fosforilação de SMAD 2 quando comparados com células normais tratadas. Culturas de FC infectadas não apresentaram aumento de fosfo-p38MAPK, mas disparo na via foi observado após tratamento com 10ng/ml de TGF- β em FC infectados. Aumento na fosforilação de c-Jun após a infecção e após tratamento com 10ng/ml de TGF- β também foi detectado em FC. Em conjunto, nossos dados sugerem que a expressão de FN é modulada diferencialmente por TGF- β em mioblastos L6E9, FC e CM, e que as vias moduladas por SMADs, p38 MAPK e c-Jun possam estar participando no processo de regulação de fibrose mediado pela citocina TGF- β após infecção pelo *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

REGULATORY ROLE OF TGF- β IN THE EXTRACELLULAR MATRIX OF SEVERAL CELL TYPES AND ITS EFFECT AFTER TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Tatiana Araújo Silva

The most severe manifestations of Chagas disease are cardiomyopathy and cardiac fibrosis, but the skeletal muscle tissue is also affected by *T. cruzi* infection, resulting in necrosis and myositis. The accumulation of extracellular matrix (ECM) during the fibrosis process is involved in the pathogenesis of Chagas disease, but the mechanisms of its regulation during infection are not clear yet. Therefore, we propose to compare the response of cardiomyocytes (CM), cardiac fibroblasts (CF) and skeletal myoblasts (L6E9) infected with *T. cruzi* after TGF- β stimulation, which is an important fibrogenic cytokine involved in the development of Chagas cardiomyopathy, also analyzing the signaling mechanisms involved in this process. CF were purified from CM cultures. Adequate purification was obtained after the 5th dissociation of CM cultures, as revealed by low detection of desmin, a cardiomyocyte-specific protein. Cultures of normal and *T. cruzi* (Y strain) infected CM, CF and L6E9 were treated for 1h or 48 hs with TGF- β (1-10 ng/ml). The expression of FN, phosphorylated SMAD 2 (PS2), phospho-p38, and phospho-c-Jun were also evaluated by Western blot (WB) after 1h and 48h treatment with TGF- β (1-10 ng / ml). WB analysis revealed that CF and L6E9 showed an increase in FN expression from 1ng/ml of TGF- β , contrasting to CM, in which an increased in ECM was only observed after 15ng/ml treatment. *T. cruzi* infection induced a decrease in the expression of this ECM component in L6E9. CF presented FN modulation according to the degree of infection of the culture, with cultures containing a low degree of infection presenting a reduction of FN and highly infected cultures showing an increase of this ECM protein. The distribution of fibronectin (FN) was also analyzed by indirect immunofluorescence. CF and L6E9 displayed a raise in FN expression from 1 ng/mL, confirming WB. After *T. cruzi* infection, disorganization and reduced FN expression was observed in infected CM, CF and L6E9, while adjacent uninfected cells showed similar FN profiles as controls. The differential response between cellular types facing TGF- β stimulation results from distinct intracellular signaling mechanisms, since CF and L6E9 have higher activation of SMADs pathway than CM, while p38 pathway (independent of SMADS) is less stimulated in CF when compared to CM and L6E9. We also evaluated the protein expression profile of classical and alternative TGF- β signaling pathways in normal and *T. cruzi* infected CF cultures, treated with 10 ng/ml of the cytokine. Infected CF cultures treated with TGF- β (10ng/ml) showed a reduction in the levels of phosphorylation of SMAD 2 when compared with normal and treated controls. CF infected cultures did not show increased phosphorylation of p38MAPK, but activation in the pathway was observed after treatment with 10 ng/ml TGF- β . An increase in phosphorylation of c-Jun after infection and after treatment with 10 ng/ml TGF- β was also detected in CF. When considered together, our data suggest that FN expression is differentially modulated by TGF- β in L6E9 mioblasts, CF and CM, and pathways modulated by SMADS, p38 MAPK and c-Jun may be participating in fibrosis regulatory process mediated by with TGF- β cytokine after *T. cruzi* infection.

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 - Doença de Chagas	17
1.1.1 - Agente etiológico, ciclo de vida, transmissão e epidemiologia	17
1.2 - Formas clínicas da doença.....	21
1.2.1 - Fase aguda e crônica	21
1.3 - Tratamento na Doença de Chagas	22
1.4 - Principais mecanismos patogênicos da Doença de Chagas.....	23
1.4.1 - Auto – imunidade.....	24
1.4.2 - Persistência do parasito	24
1.5 - Matriz extracelular e fibrose chagásica	25
1.5.1 - Matriz Extracelular	25
1.5.2 - Fibronectina.....	26
1.5.3 - Fibrose na doença de Chagas	29
1.6 - Fibroblastos cardíacos	31
1.7 - Músculo esquelético	32
1.8 - TGF- β	33
1.8.1 - TGF- β e a doença de Chagas.....	37
1.9 - Justificativa	39
2. OBJETIVOS	41
2.1 - Objetivo geral.....	41
2.2 - Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
4. RESULTADOS.....	50
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES	91
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO	17
	Figura 1.1	18
	Figura 1.2	21
	Figura 1.3	25
	Figura 1.4	27
	Figura 1.5	29
	Figura 1.6	34
	Figura 1.7	37
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
4	RESULTADOS	50
	Figura 4.1.....	52
	Figura 4.2A e B	56
	Figura 4.3A e B	60
	Figura 4.3C e D	62
	Figura 4.4	66
	Figura 4.5	68
	Figura 4.6A e B	71
	Figura 4.7A e B	74
	Figura 4.8A e B	78
	Figura 4.8C	79
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÃO	91
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	92
	Figura 7.1	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA - Albumina de soro bovino
CCC- Cardiomiopatia chagásica crônica
C-Jun – Cinase N-terminal
DABCO - 1,4 - diazabicyclo- (2,2,2)- octano
DAPI - 4,6- diamidino- 2- fenilindol
DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco's
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA - Ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil)-N,N,N',N'-tetra-acético
FAK – Cinase de adesão focal
FC – Fibroblasto cardíaco
FN- Fibronectina
GAGs – Glicosaminoglicanos
LAP- Peptídeo associado à latência
LM – Laminina
LTBP – Proteína de ligação ao TGF- β latente
MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MC – Músculo Cardíaco
MEC – Matriz Extracelular
PBS - Tampão fosfato com salina
PFA – Paraformaldeído
PS2 – SMAD 2 fosforilada
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil
q.s.p. - quantidade suficiente para
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*
TBST – Tampão tris com salina e detergente tween 20
TGF- β – Fator de crescimento e transformação β
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
TRITC - Isotiocianato de tetrametilrodamina
T β RI – Receptor de TGF- β do tipo I
T β RII – Receptor do TGF- β do tipo II
T β RIII – Receptor do TGF- β do tipo III
BiP – Proteína de ligação

|

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Doença de Chagas.

1.1.1– Agente etiológico, ciclo de vida, transmissão e epidemiologia.

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado digenético pertencente a ordem *Kinetoplastida* e a família *Trypanosomatidea*, que é o agente etiológico da doença de Chagas (1,2). Possui três formas evolutivas durante seu ciclo biológico: formas tripomastigotas (metacíclicas e sanguíneas), epimastigota e amastigota, sendo estas diferenciadas pela posição do flagelo, cinetoplasto e núcleo (3).

O parasito *T. cruzi* é digenético, possuindo ciclo de vida complexo porque possui a capacidade de infectar o vetor, hospedeiros vertebrados como os animais silvestres e o homem e por possuir diferentes formas evolutivas como epimastigota, amastigota e tripomastigota sanguíneo e metacíclico. O triatomíneo (barbeiro) é encontrado em áreas silvestres, peridomiciliares e domiciliares e torna-se infectado quando se alimenta do sangue de animais ou o homem infectado com *T. cruzi* (4). Após o repasto sanguíneo, o vetor defeca no local com suas fezes/urina contaminadas com o parasito. As fezes do inseto contêm formas tripomastigotas metacíclicas que podem entrar no hospedeiro através de fissuras na pele ou mucosas levando a lesões oculares como o sinal de Romana. No hospedeiro, formas tripomastigotas metacíclicas são internalizadas em células próximas ao local de inoculação, como macrófagos, e diferenciam-se em formas amastigotas intracelulares que são formas proliferativas do parasito. Formas amastigotas então se multiplicam intracelularmente por fissão binária e após sucessivas divisões, o parasito se diferencia novamente para forma tripomastigota sendo liberado para a corrente sanguínea, podendo assim infectar células em tecidos mais distantes. O “barbeiro”, ao alimentar-se do hospedeiro, seja ele o homem ou um animal infectado, ingere formas tripomastigotas sanguíneas e, no seu intestino médio, estas formas diferenciam-se para formas epimastigotas que são formas proliferativas no inseto vetor. Após sucessivas divisões por fissão binária, no intestino posterior, formas epimastigotas diferenciam em tripomastigotas metacíclicas e, ao realizar uma nova alimentação, o vetor pode reinfestar novos hospedeiros, dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (Fig. 1.1) (5).

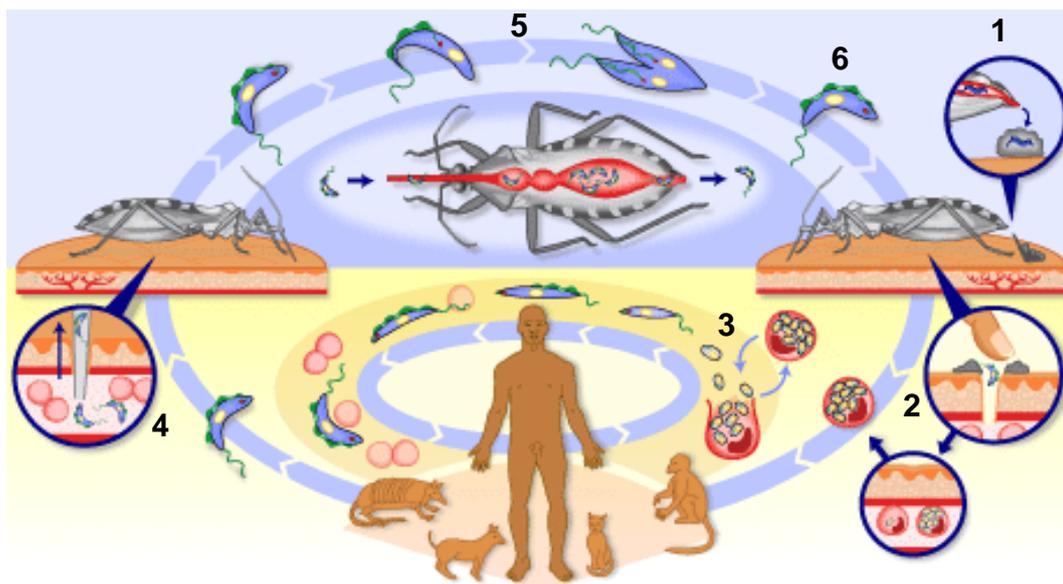


Fig 1.1 – Ciclo de vida do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrado e vertebrado.

1) O vetor triatomíneo defeca no local da picada depositando fezes/urina contendo formas tripomastigotas metacíclicas. 2) Formas tripomastigotas metacíclicas entram no hospedeiro através de fissuras na pele ou mucosas, e invadem células próximas ao local de inoculação, como macrófagos, diferenciando-se em formas amastigotas intracelulares que são formas proliferativas do parasito. 3) Formas amastigotas multiplicam-se e após sucessivas divisões, o parasito se diferencia novamente para forma tripomastigota sendo liberado para a corrente sanguínea, podendo assim infectar células em tecidos mais distantes. 4) O inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas durante alimentação. 5) No intestino médio do triatomíneo, formas tripomastigotas diferenciam-se para epimastigotas, formas proliferativas no inseto vetor. 6) Após sucessivas divisões, formas epimastigotas diferenciam em tripomastigotas metacíclicas e, ao realizar uma nova alimentação, o vetor pode reinfestar novos hospedeiros, dando continuidade ao ciclo biológico do parasito.

Fonte: http://www.who.int/tdr/diseases-topics/chagas/chagas_f1.jpg?ua=1 - acessado em 10/03/2015.

A transmissão do parasito ocorre naturalmente através do vetor triatomíneo da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*. Os principais vetores envolvidos na transmissão pertencem a três gêneros, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Nesses gêneros, cinco espécies destacam-se de acordo com sua distribuição local como o *Triatoma infestans*, encontrado principalmente na região sul da América do Sul, *Rhodnius prolixus* na região norte da América do Sul e na América Central; *Triatoma dimidiata* no México, *Panstrongylus megistus* a partir do sul-ocidental dos Estados Unidos até Argentina, Brasil e Paraguai; e *Triatoma brasiliensis* no Brasil e na Amazônia (6). A forma de transmissão do *T. cruzi* através das fezes/urina do triatomíneo ainda continua sendo a forma mais prevalente para o hospedeiro

humano. Outros mecanismos de transmissão do parasito também ocorrem através de transfusão sanguínea; via oral, sendo detectados recentemente diversos surtos no Brasil, com pessoas infectadas com *T. cruzi* através da ingestão de comidas e bebidas (como o açaí e a caldo de cana-de-açúcar) contaminados com fezes do triatomíneo (7); vertical ou congênita com a passagem do parasito através de barreiras presentes na placenta; transplante de órgãos com a presença de parasito no tecido; ingestão de leite materno contaminado e mais recentemente descrito por relações sexuais com o contato do homem com a mulher infectada no período menstrual (8).

Tradicionalmente, a doença de Chagas é descrita como endêmica no continente americano, acometendo países da América Central até a América do Sul. Dentre os países latino americanos, 21 destes são endêmicos para a doença de Chagas (9). É estimado que 7-8 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* na América Latina e cerca de 25 milhões de pessoas estejam sob áreas de risco para a doença de Chagas (10).

Inicialmente, o cenário epidemiológico da doença se concentrava nos países da América Central e do Sul. A doença de Chagas por ser uma doença negligenciada, afeta a população que vive em ambientes rurais, sob condições de pobreza. Com a instalação do homem nas áreas rurais, o triatomíneo se adaptou ao ambiente doméstico. Locais como rachaduras das paredes de barro das casas e até mesmo telhados servem como abrigo para esses insetos vetores. A presença de animais peridomiciliares também atua como reservatório para o parasito e infecção do triatomíneo através do repasto sanguíneo (11). No entanto, a intensa urbanização da população que vivia em áreas rurais tem tornado a doença de Chagas um grande problema urbano, médico e social, introduzindo assim novos riscos de transmissão do parasito nas áreas não-endêmicas, principalmente através da transfusão de sangue. Em 1950, o governo brasileiro promoveu campanhas em algumas regiões para controlar o vetor, *Triatoma infestans*. Somente em 1980 essas campanhas foram implantadas em todo o território nacional. A erradicação do vetor teve um grande sucesso não só no Brasil, mas em outros países que foram certificados livres da transmissão do vetor, incluindo o Uruguai e Chile. Porém, na Bolívia, há a presença do vetor *T. infestans* (8). Hoje, os bancos de sangue são controlados no Brasil e em muitos outros países da América Latina. No entanto, países como a Bolívia ainda apresentam um grande problema com relação ao controle nos seus

bancos de sangue, já que metade dos seus doadores podem estar infectados com o *T. cruzi* (12).

Atualmente, a doença de Chagas tem um novo quadro epidemiológico apresentando um desafio econômico, político e social. Imigrantes portadores da doença de Chagas acabam carreando o parasito de regiões endêmicas para países não-endêmicos. Países como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e países europeus como a Espanha, Bélgica, França, Itália, Inglaterra e Suíça, apresentam casos de pacientes infectados com *T. cruzi* (Fig 1.2). Devido a ausência do vetor nesses países não-endêmicos, ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão vertical da mãe para o filho e acidentes laboratoriais têm sido formas mais diretas de transmissão (13). No entanto, dados revelam que a região sudoeste dos Estados Unidos apresenta uma grande diversidade de triatomíneos que se abrigam em ninhos de roedores silvestres, que funcionam como o reservatório de *T. cruzi* mais comum nessa região. Devido à intensa migração para os EUA de latino-americanos, previamente residentes de áreas endêmicas, atualmente cerca de 300 mil pessoas encontram-se infectadas com o parasito neste país. Ainda, há relatos de transmissão vetorial no sul dos EUA devido a presença de reservatórios infectados na região. A partir dessa informação, juntamente com casos de pessoas infectadas no país, bancos de sangue nos EUA passaram a fazer triagem contra o parasito que causa a doença de Chagas (14). Esse quadro de infecção apresentado mundialmente mostra que é preciso melhorar o sistema de vigilância em países não-endêmicos, com controles nos bancos de sangue e de transplante de órgãos, incluir um diagnóstico diferencial para a doença de Chagas, e interceptar a transmissão vertical (15) .

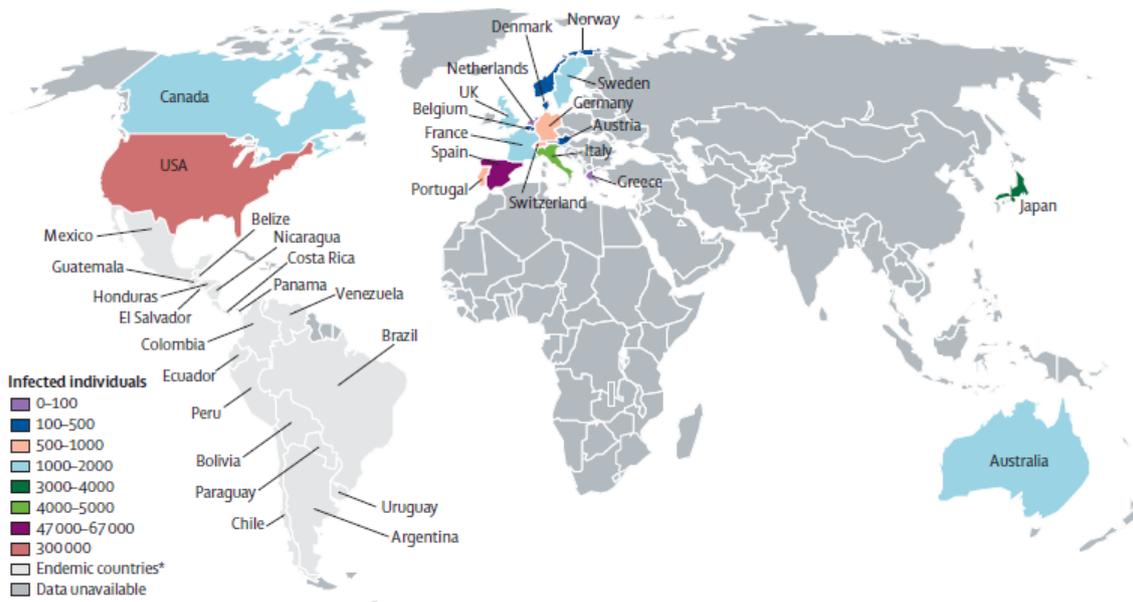


Fig 1.2 – Cenário epidemiológico atual da doença de Chagas mostrando a expansão para países não endêmicos (Rassi & Marin-Neto 2010 (8)).

1.2 – Formas clínicas da doença.

1.2.1 – Fase aguda e crônica.

Uma vez o parasito inoculado no hospedeiro, inicia-se então o estágio inicial de infecção do patógeno. A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases: aguda e crônica (16).

A fase aguda persiste durante 4-8 semanas e após esse período evolui para a fase crônica que dura a vida toda do paciente. A fase aguda pode ser assintomática, com intensa presença do parasito no sangue, podendo assim infectar uma grande variedade de células. O diagnóstico de indivíduos durante a fase aguda da doença de Chagas é raro devido aos sintomas clínicos observados serem relativamente inespecíficos na maior parte dos pacientes infectados. No entanto, 5-10% dos pacientes na fase aguda podem manifestar sintomas que incluem febre prolongada, mal-estar, aumento do fígado, baço, gânglios linfáticos, edema subcutâneo e, no caso particular da transmissão por vetor, sinais da porta de entrada do *T. cruzi* (chagoma de inoculação) através da mucosa. O desenvolvimento de miocardite e meningoencefalite são encontrados em casos sintomáticos na fase aguda da doença levando indivíduos infectados ao óbito (17). Esse quadro está relacionado com a presença de células inflamatórias no local da infecção. Essas células são direcionadas a eliminar o parasito presente nas células impedindo sua proliferação e

infecção tecidual (18). O diagnóstico da doença de Chagas na fase aguda pode ser feito através de evidências diretas em amostras de sangue fresco contendo o parasito ou por métodos indiretos, como xenodiagnóstico ou hemocultura (19).

Se a doença não for tratada ou se o tratamento imposto falhar, a fase aguda evolui para fase crônica. Através da intensa ação da resposta imunológica contra o parasito, a presença do parasito circulante não é mais detectada e ocorre também uma diminuição na carga parasitária no tecido dificultando sua visualização no miocárdio (19). Cerca de 60-70% dos casos de pacientes na fase crônica são denominados indeterminados, possuindo sorologia positiva para a doença, mas não apresentando sinais clínicos ou físicos, com testes de eletrocardiograma (ECG) e teste radiológico do tórax normais (20). Pacientes indeterminados podem permanecer de 10 a 30 anos, ou até mesmo a vida toda, sem desenvolver patologias, não apresentando um conjunto de sintomas clínicos que o caracterizam como forma cardíaca mista ou neurológica (21).

Em torno de 10-15% dos pacientes acabam desenvolvendo formas digestivas da doença de Chagas, apresentando megacólon e megaesôfago. Cerca de 20-30% dos pacientes crônicos desenvolvem anormalidades no coração como bradiarritmias e taquiarritmias, aneurisma apical, falha cardíaca, tromboembolismo, que podem levar a morte súbita. A cardiomiopatia é a manifestação sintomática mais importante na doença causando grandes impactos sociais e econômicos tanto no Brasil como em outros países endêmicos devido a alta morbidade e mortalidade (3). Na fase crônica, quando o paciente desenvolve formas cardíacas da doença, é observado uma diminuição no grau de parasitismo nas fibras musculares cardíacas e, associados a essa diminuição, um aumento de células inflamatórias causando inflamação no local gerando sérios danos no miocárdio (5). Este aumento de infiltrados inflamatórios com a liberação de citocinas e quimiocinas favorece tanto a migração de células para o local da injúria como o aumento da deposição de componentes de matriz extracelular, promovendo o remodelamento e a cicatrização tecidual (22,23).

1.3 – Tratamento na doença de Chagas.

Atualmente, somente duas drogas estão disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benzonidazol, que são compostos nitroheterocíclicos descobertos em 1965 e 1971 respectivamente (24). O nifurtimox e

benzonidazol são eficazes na fase aguda da doença ou quando pacientes imunocomprometidos apresentam uma reativação da doença de Chagas na fase crônica. Tanto o benzonidazol quanto o nifurtimox possuem uma eficácia variável devido a diferentes cepas de *T. cruzi* existentes (25). A eficácia do benzonidazol em reduzir a carga parasitária de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica está sendo avaliada em ensaios clínicos pelo projeto BENEFIT (sigla em inglês para Avaliação do Benzonidazol para Interromper a Tripanossomíase), realizados por diferentes organizações internacionais e de forma multicêntrica (26).

Quando benzonidazol e nifurtimox são administrados, sérios efeitos colaterais podem ser induzidos nos pacientes infectados, especialmente em adultos, incluindo anorexia, dor de cabeça, vômitos, perda de peso, insônia, mialgia, manifestações cutâneas (dermatites), edemas generalizados, febre, depressão da medula óssea, trombocitopenia, polineuropatias periféricas e perturbações no trato digestivo, que podem levar a uma descontinuação do medicamento (27).

Atualmente, diversas abordagens terapêuticas estão sob investigação. Inibidores da cruzipaina, uma protease específica do *T. cruzi* e essencial ao parasita estão em desenvolvimento pré-clínico (28). Diamidinas aromáticas, ligantes que se associam à fenda menor do DNA do parasita, podendo comprometer a íntima e específica associação de fatores de transcrição e enzimas necessárias à expressão de genes, duplicação e reparo do DNA, levando a morte celular dos parasitos, têm sido intensamente investigadas como potenciais quimioterápicos tripanossomicidas com resultados promissores (29).

Entre os agentes em desenvolvimento mais avançado estão os inibidores específicos da biossíntese de ergosterol pelo *Trypanosoma cruzi*. Entre eles, o posaconazol, fármaco antifúngico triazólico apresentou boa eficácia em modelos de infecção aguda e crônica, mas teve desempenho inferior ao benzonidazol em ensaios clínicos (30). Outros inibidores da via de biossíntese de ergosterol do *T. cruzi* estão em desenvolvimento pré-clínico e incluem VNI ((R)-N-(1-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl)-4-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)) (31), análogos de fenarimol (32) e compostos contendo o meio 4 amino-piridil (33,34).

1.4 – Principais mecanismos patogênicos da doença de Chagas.

Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar o desenvolvimento da cardiomiopatia em pacientes crônicos infectados na doença de Chagas. Patologias

como disautonomia cardíaca, denervação cardíaca, perturbações microvasculares e danos no miocárdio provocados pelo parasito e pelo sistema imune, estão entre os mecanismos que participam na doença de Chagas (17). Destacam-se como os principais mecanismos patogênicos na doença de Chagas a auto-imunidade e persistência do parasito em pacientes crônicos infectados pelo *T. cruzi*.

1.4.1 – Auto-imunidade.

Na doença de Chagas, uma das formas clínicas mais graves da doença é a destruição do miocárdio causado pela progressão do infiltrado inflamatório no tecido. A presença de linfócitos T auto-reativos tem um importante papel no desenvolvimento de patologias. A presença do *T. cruzi* ou até mesmo de seus antígenos, podem acarretar a auto-imunidade no hospedeiro infectado (14).

A auto-imunidade pode ser um dos fatores que levam a severas injúrias no tecido. Dados revelam que esses ataques imunológicos de linfócitos auto-reativos e citotóxicos são órgão-específicos, já que essas células inflamatórias são encontradas aderidas a miofibras cardíacas, mesmo livre de parasitos, levando assim à destruição celular (35). Os neurônios do sistema nervoso parassimpático também são afetados por linfócitos auto-reativos levando assim a severas patologias no tecido. Ainda na fase aguda da doença de Chagas, a auto-imunidade pode ser desencadeada pelo hospedeiro inicialmente através do contato com o parasito levando ao dano tissular ou através da reação-cruzada dos antígenos do parasito com o antígeno do hospedeiro com a perda da auto-tolerância. Na fase crônica a presença do parasito nos tecidos é de difícil detecção, mas é comprovada por técnicas de PCR e imunohistoquímica, desencadeando uma resposta auto-imune altamente patogênica através de células T citotóxicas auto-reativas que irão também atacar células não parasitadas no coração, causando dano tecidual (36).

1.4.2 – Persistência do parasito.

Na fase crônica da doença, ninhos de amastigota no tecido cardíaco não são facilmente visualizados. No entanto, estudos apontam que os danos cardíacos presentes no miocárdio podem estar associados com a persistência do parasito neste tecido (17).

Para confirmar se o dano tecidual apresentado na fase crônica está relacionado com a presença de parasitos no tecido, técnicas como

imunohistoquímica, reação em cadeia de polimerase (PCR) e hibridização *in situ*, identificaram antígenos do parasito e seu material genético como o DNA nuclear e o DNA do cinetoplasto (kDNA) (Fig 1.3) (37).

Antígenos de *T. cruzi* (setas)

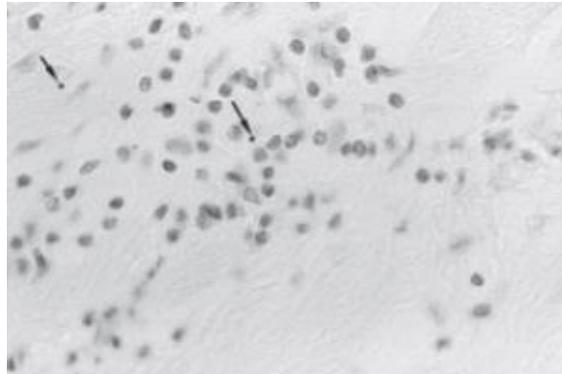


Fig 1.3 – Fragmentos do miocárdio obtidas de biópsia de paciente com doença de Chagas. A presença de antígenos do parasito no tecido cardíaco, revelada por imunohistoquímica, é capaz de acionar respostas imunológicas e resultar em danos cardíacos (Marin-neto et al, 2007 (16).

Em pacientes imunocomprometidos, evidências clínicas apontam para a persistência do parasito nos tecidos uma vez que há reativação da doença de Chagas na fase crônica. Essa persistência que ocorre em associação com outros mecanismos, favorece o desenvolvimento de graves patologias encontradas no miocárdio na doença de Chagas (38).

1.5 – Matriz Extracelular e fibrose cardíaca na doença de Chagas.

1.5.1 – Matriz Extracelular.

A matriz extracelular (MEC) é uma rede constituída por diferentes tipos de proteínas e polissacarídeos organizados em associação com a superfície celular, promovendo estrutura, suporte, elasticidade, coesão e força aos tecidos e órgãos através de componentes fibrilares e microfibrilares que interagem uns com os outros (39). Além de prover estrutura física e sustentação para as células, a MEC possui um papel biológico com a regulação do comportamento das células em contato, através de fatores de crescimento estocados na MEC, modulando processos como desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função da célula (40). Exemplos de regiões especializadas e tecidos ricos em MEC são a lâmina basal e o tecido conjuntivo. A lâmina basal sustenta todo o epitélio, células musculares individuais, células adiposas e células de Schwann. Dentre as macromoléculas secretadas na

lâmina basal, a laminina é uma das principais proteínas que dá a formação inicial à lâmina basal. Colágeno IV, nidogênio e o proteoglicano perlecan também constituem a lâmina basal (40). Células presentes no tecido conjuntivo, como fibroblastos, secretam macromoléculas como fibronectina, hialuronana, fibrilina, proteoglicanos, glicoproteínas, periostina e colágeno. Certos tipos de tecidos conjuntivos encontrados em ossos e cartilagens são constituídos por células relacionadas aos fibroblastos, possuindo nomes mais específicos como condroblastos, para cartilagem e os osteoblastos, para o osso (41).

1.5.2– Fibronectina.

Uma das proteínas mais abundantes na matriz extracelular é a fibronectina (FN). A FN é uma proteína adesiva da MEC, possuindo sítios de ligação com receptores celulares e com outras proteínas estruturais da MEC, como colágenos e proteoglicanos, funcionando como uma ponte que reforça a rede de matriz e conecta a MEC às células e às moléculas solúveis do espaço extracelular (42). Além disso, a FN também regula o comportamento celular, disparando respostas específicas em processos como regulação do crescimento celular dependente de ancoragem, migração, crescimento, expressão gênica, diferenciação celular, desenvolvimento de tumores, metástases, embriogênese, angiogênese e reparo tecidual (43).

Essa proteína é encontrada na forma solúvel no plasma, ou na forma celular ou insolúvel na superfície das células. A FN plasmática é secretada por hepatócitos e a FN celular é secretada localmente por fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e outros tipos celulares, que então coordenam a sua interligação e a formação de fibrilas de FN na matriz (44).

A molécula de FN é uma glicoproteína dimérica ligada por uma ponte dissulfeto, composto de subunidades de 230-270 kDa. Cada subunidade contém três módulos repetitivos, com 12 módulos do tipo I, 2 módulos do tipo II, 15 a 17 (dependendo do splicing) do módulo tipo III e uma sequência variável V, que não é homóloga a outras regiões da FN. Cada módulo na proteína confere um domínio funcional permitindo que ocorram interações com outras proteínas de MEC, como colágeno, fibrina, heparina, com receptores de superfície celular e com outra molécula de FN, permitindo a formação de fibrilas de FN na matriz extracelular (Fig 1.4) (45).

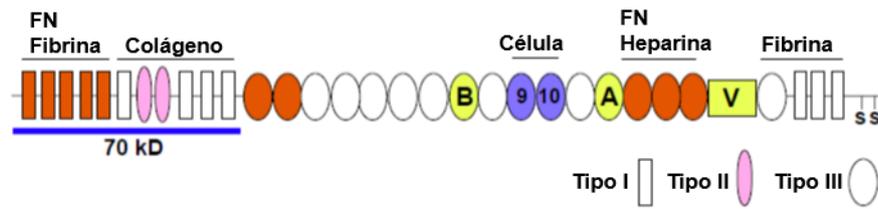


Fig 1.4 – Molécula de fibronectina e suas regiões. A molécula de FN contém regiões do módulo tipo I, tipo II e tipo III. Domínios que sofrem splicing alternativo (tipo III ED-A e ED-B) e região V estão indicados em amarelo. Domínios de ligação para fibrina, colágeno, células e heparina estão indicados, e o dímero da molécula se forma através do par de cisteínas na região C-terminal (SS) (Mao & Schwarzbauer, 2005 (43).

Na molécula de FN, o módulo do tipo III contém regiões que sofrem splicing alternativo que são chamadas de domínio extracelular A e B (ED-A e ED-B). A FN celular possui quantidades variáveis de ED-A e ED-B que são características dessa forma insolúvel da molécula, além de apresentar frequentemente a região V. Já a FN plasmática não contém os domínios ED-A e ED-B, e apenas 1 das subunidades do dímero de FN plasmática contém a região variável V (43,46).

No meio extracelular, o processo de montagem de matriz de FN inicia-se com a ligação da região N-terminal de 70kDa da molécula na superfície da célula. Essa etapa é reversível e saturável. A montagem de FN tem locais especializados e requer a participação de moléculas de integrinas e sindecans 2 e 4 (proteoglicanos de heparan sulfato transmembrana presentes na superfície da célula). O processo de montagem de FN na matriz extracelular é dependente de integrinas e de interações de FN na matriz extracelular. A FN tem como receptor transmembrana específico as integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{11b}\beta_3$. Na FN, a região do tipo III, III8-III10, é responsável por ligar à integrinas na superfície celular. A sequência III10 contém os aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), que formam a sequência RGD da proteína que vão ligar à integrinas dando início ao processo de montagem de FN na matriz extracelular mediado pela célula (Fig 1.5A). Essa sequência RGD é importante na etapa inicial na formação de fibrilas de FN na matriz extracelular, no entanto, nas últimas etapas, essa sequência não é mais necessária (45). O receptor $\alpha_5\beta_1$ é o receptor primário para montagem de FN na matriz extracelular. Outros receptores como $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{11b}\beta_3$ não são capazes de montar fibrilas de FN na matriz extracelular sem ação de tratamentos que permitam aumentar sua atividade. A montagem dessas fibrilas de FN depende da resistência

da FN às integrinas e à sinergia de FN no local. Essa interação e sinergia de FN-integrinas, aciona intracelularmente vias de sinalização que participam no processo de montagem de matriz extracelular. No meio intracelular, integrinas se associam a filamentos de actina, processo essencial para montagem e manutenção de fibrilas de FN na superfície da célula. Para que haja interação de FN, integrinas e o citoesqueleto é necessária a interação de proteínas adaptadoras e sinalizadoras que se ligam à região $\beta 1$ na integrina como talina, vinculina, paxilina e FAK (cinase de adesão focal) (47).

A proteína FAK tem um papel importante na sinalização acionada por integrinas e é essencial para montagem de fibrilas de FN na matriz extracelular. Membros da família Src cinase atuam junto com FAK na montagem de FN. Src ativada fosforila paxilina, promovendo a polimerização e contratilidade do citoesqueleto de actina mediado pelas proteínas actina-miosina, e auxiliando assim a montagem de FN no meio extracelular. Proteoglicanos transmembranas sindecans também têm sido implicados em muitos eventos intracelulares que acompanham a ligação integrina-FN. Sindecan 2 e 4 promovem a montagem de FN e de outras moléculas na matriz extracelular. Eles também iniciam cascatas de sinalização intracelular que envolvem proteínas cinase C (Sindecan-4) e proteínas domínio PDZ (sindecan-2) (48).

A molécula de FN sofre alterações alostéricas após a geração de condições de tensão impostas pela polimerização do citoesqueleto e a ligação com as integrinas, se desenovelando e expondo sítios de ligação da FN com ela mesma que não estavam acessíveis anteriormente e permitindo interações intermoleculares requeridas para incorporação da FN em fibrilas (Fig 1.5 B-C) (44).

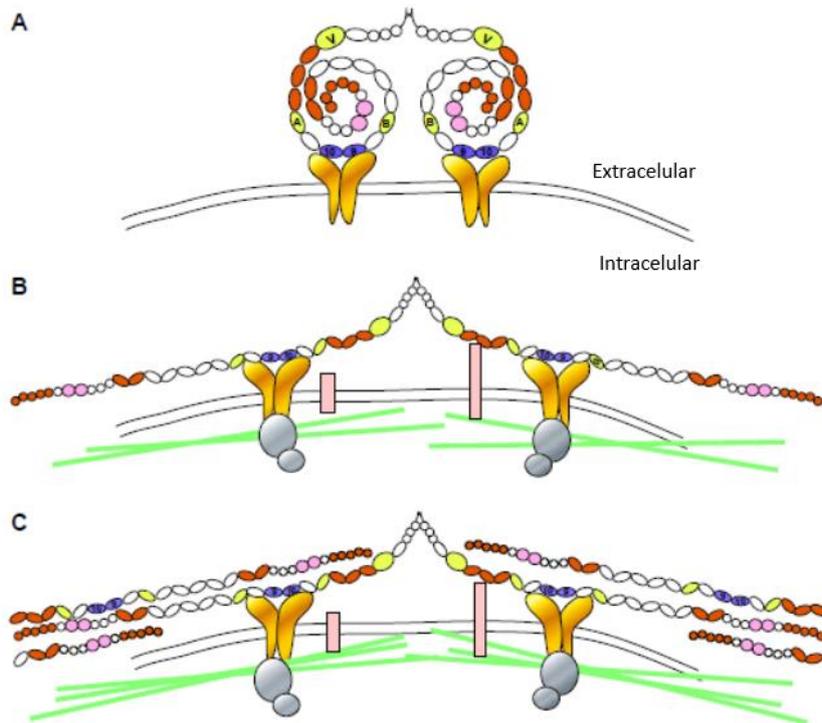


Fig 1.5 – Formação de fibrilas de FN na matriz extracelular. (A) Ligação da FN à integrinas na superfície de célula através da sequência RGD. (B) Este evento dispara vias de sinalização que resultam na polimerização e contratilidade do citoesqueleto, criando condições de tensão que desenovelam a molécula de FN. (C) O desenovelamento da FN permite interações intermoleculares requeridas para incorporação da FN em fibrilas (Mao & Schwarzbauer, 2005 (43)).

1.5.3 – Fibrose na doença de Chagas.

O processo de fibrose pode acometer diferentes órgãos, constituindo causa majoritária de morbidade e mortalidade. A fibrose consiste em acumulação progressiva de tecido conjuntivo e excessiva deposição de colágeno, resultando em substituição da arquitetura normal do tecido e conseqüente perda de sua função. Desbalanços decorrentes entre a produção e a degradação de MEC, levam ao surgimento do quadro fibrótico com a substituição gradual do tecido funcional por tecido conjuntivo, em um processo regido por citocinas e fatores de crescimento solúveis que regulam a migração, proliferação e diferenciação celular (48,49). O desenvolvimento da fibrose ocorre durante processos fisiológicos de remodelamento após danos teciduais causados por lesões de diferentes origens, incluindo agentes patológicos. A fibrose cardíaca é caracterizada pelo aumento exarcebado de proteínas de matriz extracelular no miocárdio. Diversas condições podem induzir fibrose cardíaca, incluindo hipertensão e infarto do miocárdio, e pacientes com

doença de Chagas crônicos sintomáticos também frequentemente apresentam esta patologia (49).

O miocárdio é um músculo cardíaco composto por cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos, células endoteliais, células de músculo liso e matriz extracelular. Em condições patológicas no miocárdio, o remodelamento tecidual ocorre após a quebra da rede de matriz extracelular que interrompe conexões entre as células presentes no miocárdio e entre os vasos sanguíneos, comprometendo assim a integridade estrutural e o funcionamento do coração (50).

Quando o paciente desenvolve a forma cardíaca na fase crônica da doença, são observadas alterações no miocárdio que incluem o desenvolvimento da fibrose. Com o aumento na deposição de proteínas de matriz no tecido, ocorre uma modificação estrutural no miocárdio. O ventrículo esquerdo desses pacientes infectados encontra-se comprometido já que ocorre um aumento na espessura da parede ventricular, levando a alterações elétricas no tecido cardíaco. Relatos de ensaios clínicos utilizando ressonância magnética cardíaca mostraram a correlação entre a fibrose cardíaca e a presença de arritmia ventricular em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (51).

A instalação da fibrose inicia-se ainda na fase aguda da doença, com intensa miocardite em decorrência da infecção de cardiomiócitos pelo *T. cruzi*, sendo esse evento um momento inicial para ativação de sinais fibrogênicos no miocárdio. Com a infecção de células do miocárdio pelo *T. cruzi*, células do infiltrado inflamatório como macrófagos e leucócitos são ativados para o local da injúria e liberam mediadores inflamatórios no tecido cardíaco para o reparo tecidual. Quando a doença evolui para fase crônica, é observada uma redução na carga parasitária no miocárdio e, antígenos do patógeno e do próprio hospedeiro são capazes de disparar células inflamatórias para conter a lesão (52).

Mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas derivadas de células sanguíneas como plaquetas ou células epiteliais, proteases como metaloproteinases de matriz (MMPs), e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), contribuem para o processo fibrogênico. Entre eles, o TGF- β 1 (fator transformador do crescimento β) e o fator do tecido conectivo (CTGF) são considerados interruptores moleculares para a indução da fibrose cardíaca (53).

MMPs e TIMPs mantêm a homeostase tecidual com a manutenção da integridade da matriz extracelular e atuam também em condições patológicas. Em uma lesão cardíaca, células do infiltrado inflamatório juntamente com cardiomiócitos, irão liberar MMPs que irão degradar proteínas de matriz extracelular, favorecendo a migração e a motilidade de fibroblastos cardíacos para o local da injúria e iniciando o processo de remodelamento tecidual com a deposição de proteínas de matriz (54).

1.6 – Fibroblastos cardíacos (FC).

Fibroblastos são as principais células efectoras da fibrose, sendo responsáveis pela secreção de MEC (54). São células residentes do miocárdio originadas a partir de células epicárdicas. Essas células dão origem a células epiteliais que irão sofrer a transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo biológico onde células polarizadas interagem com a membrana basal, disparando mudanças bioquímicas, e originando células mesenquimais, o que proporciona capacidade migratória, invasão, elevada resistência a apoptose e produção de componentes de matriz extracelular (55). Células endoteliais também dão origem a células mesenquimais através da transição endotélio-mesenquimal (EndMT). No desenvolvimento do miocárdio, um subconjunto dessas células mesenquimais adquire propriedades migratórias e invade o tecido cardíaco, ocupando a posição intersticial entre cardiomiócitos, e tornando-se fibroblastos residentes (53).

Uma das funções primárias do fibroblasto cardíaco é a manutenção, homeostase e a integridade da matriz extracelular, incluindo o remodelamento e renovação de componentes de matriz extracelular com a deposição de colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos. A rede de MEC é importante porque estoca citocinas e fatores de crescimento que auxiliam na fisiologia e no fenótipo de células cardíacas. A MEC proporciona sinais mecânicos para cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e células do vaso sanguíneo no miocárdio (56). Além de produzir MEC, fibroblastos cardíacos também sintetizam proteínas que regulam a matriz como MMPs - que degradam proteínas de MEC e TIMPs - proteínas que inibem a ação das MMPs. O balanço entre MMPs e TIMPs permite a homeostase do tecido cardíaco (54).

Além disso, os fibroblastos cardíacos também estão em constante comunicação celular com cardiomiócitos, o que inclui atividade elétrica ocorrendo conexão com cardiomiócitos via junções gap, (constituídas de conexinas Cx40,

Cx43, Cx45), sendo os fibroblastos células essenciais para condução elétrica do coração. Os fibroblastos cardíacos também produzem fatores de crescimento e citocinas que promovem sinalização intercelular com outros fibroblastos cardíacos, células endoteliais ou células de músculo liso, modulando eventos como angiogênese, proliferação celular, hipertrofia de cardiomiócitos ou apoptose (50).

Quando o tecido cardíaco sofre uma injúria, células cardíacas acionam amplificação de fibroblastos cardíacos residentes, transformação de células endoteliais ou epiteliais para FC ou o recrutamento de células hematopoiéticas originadas a partir de células da medula óssea para o local da injúria acarretando numa transformação de fibroblastos cardíacos para miofibroblastos (50). Miofibroblastos são células contráteis que possuem uma motilidade maior, tendo como principal função uma forte capacidade de síntese de proteínas de MEC. Miofibroblastos não são encontrados no miocárdio saudável, estando presentes somente no caso de injúria cardíaca. Miofibroblastos expressam marcadores específicos que estão ausentes em FC, como a α -actina de músculo liso (α SMA), uma proteína de citoesqueleto envolvida na contratilidade celular. Fatores de crescimento como TGF- β , citocinas, e a própria MEC promovem a transformação de FC para miofibroblastos. Essa mudança de FC para miofibroblastos muda o balanço da MEC, levando ao aumento na síntese e deposição de componentes de MEC característicos da fibrose, que podem substituir os miócitos e/ou interromper interações miócito-miócito no miocárdio prejudicando a função cardíaca.

1.7 – Músculo esquelético.

O músculo esquelético é um tecido dinâmico do corpo humano. Cerca de 40% do peso total do corpo é formado por músculo esquelético. Sua composição é formada por 75% de água, 20% de proteínas (contráteis, regulatórias e citoesqueleto) e 5% de outras substâncias que incluem sais inorgânicos, minerais, gordura e carboidratos. Esse tecido é formado por um arranjo de fibras musculares, multinucleadas, associadas ao tecido conectivo. O tamanho do músculo esquelético é determinado pelo número e pelo tamanho das miofibras individuais. Condições patológicas como a deposição de gorduras e de tecido conectivo podem alterar sua composição (57).

Células satélites são células tronco adultas do músculo esquelético importantes no crescimento da fibra muscular, no reparo e na regeneração. A

ativação de células satélites por fatores miogênicos permite a proliferação e a diferenciação em novas fibras musculares. Estudos indicam que a relação de células satélites diminui com a vida pós-natal de 30-35% para 1-4% na vida adulta (58). Miostatina, proteína membro da família do TGF- β , possui uma importante função no metabolismo do músculo esquelético através da regulação do tamanho da miofibrila em condições fisiológicas e patológicas (59). Essa proteína atua como um regulador negativo da massa muscular esquelética e possui um papel importante na embriogênese, regulando o desenvolvimento do músculo esquelético e o número final de miofibras que são formadas (60). Na vida adulta, a miostatina é produzida pelas células musculares, e circula pelo sangue limitando o crescimento da miofibrila muscular. Um desbalanço na sinalização da miostatina nas células musculares leva a alterações no metabolismo celular gerando atrofia (quando ocorre um aumento na síntese de miostatina) e hipertrofia (quando ocorre uma redução de miostatina nas células musculares esqueléticas) (59).

Embora as principais manifestações clínicas da doença de Chagas localizem-se no coração e no sistema digestivo, o tecido muscular esquelético também apresenta parasitismo nas miofibras (61,62). Células musculares esqueléticas, já foram descritas também como sítios de persistência do parasita (63). No curso da infecção ocorre a degeneração do miócito provocados pelo parasito, além de miosite e necrose das miofibras durante as fases aguda e crônica, mudando a estrutura das miofibras e levando a dores musculares e fraquezas em pacientes infectados com *T. cruzi* (64). No período tardio da infecção, o parasitismo e a inflamação diminuem. No entanto, o processo de regeneração neste período pode resultar na substituição do tecido muscular por fibrose em alguns modelos de interação *T. cruzi*- hospedeiro (65).

1.8 – TGF- β .

O fator transformador do crescimento β é uma citocina que está envolvida em diversos processos biológicos e fisiológicos, desde a embriogênese até a homeostase do tecido adulto. Dentre as principais funções, o TGF- β atua no controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose, síntese de componentes de matriz extracelular e controle das respostas imunológicas. A desregulação da transdução do sinal está associada ao desenvolvimento de doenças humanas, como o câncer e a fibrose (66). O TGF- β é uma proteína de peso molecular de 25kDa, que possui

atividade pleiotrópica e pertence a uma superfamília de citocinas que incluem TGF β s, proteínas morfogênicas do osso (BMP's), activinas, inibinas, Nodal, hormônio anti-Mülleriano (AMH) e fatores de crescimento e diferenciação (GDFs). Essas citocinas são altamente conservadas ao longo da evolução e são encontradas em todos os organismos multicelulares (67).

O TGF- β apresenta três isoformas altamente homólogas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, que são codificados por três genes distintos encontrados em espécies de mamíferos. O TGF- β 1 é a isoforma mais encontrada, quase ubíqua, considerando que outras isoformas são limitadas a determinados tipos celulares e tecidos (68).

O TGF- β é sintetizado na forma latente, devido a associação do peptídeo LAP (peptídeo associado a latência) com o TGF- β maduro, sendo incapaz de interagir com seus receptores específicos e exercer assim seu papel biológico. A interação do LAP com o TGF- β ativo forma o pequeno complexo latente (SLC – Small Latency Complex). A ligação de uma proteína de ligação ao TGF- β latente (LTBP) com a LAP forma o grande complexo latente (LLC – Large Latency Complex) (Fig 1.6). Após a síntese, a citocina é excretada no meio extracelular, sendo estocada em associação com proteínas de matriz extracelular até sua ativação, processo que torna-o livre para interagir com seus receptores específicos (69). A ativação do TGF- β envolve a clivagem de proteínas que formam o grande complexo latente de proteínas de matriz extracelular, como fibronectina e colágeno. O LAP é clivado através de ações proteolíticas com ação de diversas enzimas, incluindo plasmina, metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9) e trombospondina-1. Alterações no meio como mudanças de pH e o estresse mecânico também promovem a ativação do TGF- β . O receptor integrina α V β 6 ativa TGF- β ligando-se na sequência RGD presente no LAP liberando a citocina do pequeno complexo latente (70).

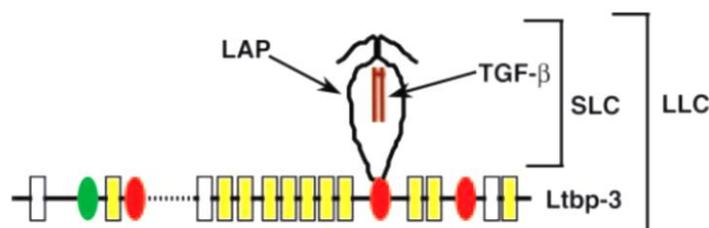


Fig 1.6 – Complexo latente do TGF- β . O TGF- β é secretado na forma latente associado a proteínas que conferem latência. O pequeno complexo latente (SLC) é formado pelo LAP, uma proteína que confere a latência, juntamente com o TGF- β maduro. O grande complexo latente (LLC) é formado pela associação do LAP com uma proteína de ligação ao TGF- β latente (LTBP) (Rifkin, 2005 (68)).

A sinalização pelos membros da família do TGF- β ocorre através de receptores específicos na superfície celular: receptores do tipo I, II e III, que existem em virtualmente todos os tipos celulares. Os receptores do tipo III, também chamado de betaglicanos ou endoglicanos, funcionam como co-receptores auxiliares, apresentando a citocina aos seus outros dois receptores, e participando da regulação da via de sinalização da superfamília do TGF- β . Os receptores do tipo I, também conhecidos como cinases semelhantes ao receptor de ativina (Activin-like Kinase ou ALK) são expressos em diversos tipos celulares, possuindo sete isoformas distintas, incluindo ALK 1, 2, 3, 4, 5 6 e 7. Células endoteliais expressam especificamente ALK1 e epiteliais ALK5 (71). A ligação do TGF- β ativo com o receptor do tipo II induz a formação do complexo heterotrimérico entre os receptores do tipo II (T β RII) e do tipo I (T β RI) que possuem atividade serino/treonino cinase. A ligação do TGF- β no receptor do tipo II promove a transfosforilação do receptor do tipo I, propagando o sinal na célula através de efetores *downstream* com a fosforilação de proteínas da via clássica (canônica) de sinalização do TGF- β . A via clássica do TGF- β é constituída de proteínas SMADS (1-7), sendo SMAD 2 e 3 fosforiladas pelo receptor ALK 4 ALK5 e ALK7 e SMAD 1, SMAD5 e SMAD 8 fosforiladas pelo receptor ALK1, ALK2, ALK3 e ALK6 bem como receptores da proteína morfogenética do osso (BMP). SMADS ligadas ao receptor, R-SMADS (SMAD2 e SMAD3) recebem o sinal do ligante e iniciam a sinalização da via clássica do TGF- β . No entanto, R-SMADS não são capazes de translocar o sinal para o núcleo. Proteínas SMAD mediadoras ou co-SMAD (SMAD4) auxiliam na transdução do sinal formando um complexo com R-SMADS, sendo então translocadas para o núcleo, onde eles ativam ou reprimem a transcrição do gene dependendo do recrutamento de coativadores ou corepressores no complexo transcripcional. SMADS 6 e SMAD 7 são proteínas inibitórias da via clássica de sinalização do TGF- β que interferem na fosforilação de R-SMADS regulando a via clássica de sinalização. A ação de SMAD 1 e 5 induzem a expressão de SMAD 6 enquanto que SMAD 3 induz a expressão de SMAD 7 disparando um ciclo com feedback inibitório que suprime os efeitos mediados pelo TGF- β (68).

Além da via clássica, o TGF- β também modula vias alternativas (não-canônicas) transmitindo sinal através de outros fatores, como fator associado ao receptor 4 e 6 (TRAF4 e TRAF6), cinase ativada por TGF- β 1 (TAK1, também

conhecido como MAPP3K7), proteína cinase ativada por mitógenos p38 (p38MAPK), RHO, fosfoinosítídeo cinase-3 (PI3K), AKT (também conhecido como proteína cinase B), cinase regulada por sinal extracelular (ERK), cinase N-terminal (JNK), fator nuclear-kB (NF-kB) e pequenas GTPases. A sinalização do TGF- β pode também ser influenciada por diferentes vias de sinalização que incluem PI3K-AKT, WNT, Hedgehog (HH), Notch, interferon (IFN), TNF e a via RAS implicando no desenvolvimento da via de sinalização (Fig 1.7) (67,68).

A via de sinalização alternativa do TGF- β é importante porque pode interagir diretamente com a via clássica de sinalização (SMADs) através da fosforilação de proteínas associadas ao receptor (R-SMADs). As vias alternativas disparadas pelo receptor do TGF- β podem atuar juntamente com a via de SMADs, possuindo a capacidade de modular a atividade de proteínas cinases, com a transmissão do sinal para outras vias de sinalização, potencializando o sinal e as respostas fisiológicas ao TGF- β (72).

As vias alternativas de sinalização do TGF- β melhor caracterizadas são JNK e p38MAPK. As vias JNK e p38 MAPK são vias superiores nas cascatas de sinalização e são ativados por cinases, como a MAP-cinase (MKKs) MKK4 e MKK 3/6 respectivamente. O TGF- β também dispara a ativação de cinases associadas ao TGF- β 1(TAK1) através da ativação catalítica de fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral 6 (TRAF6), processos cruciais para a ativação de JNK e p38 MAPK (73). A utilização de células deficientes em SMAD3 ou SMAD4 revelou que as proteínas SMADs são dispensáveis para a ativação da via JNK induzida pelo TGF- β . A via de JNK ativada pode fosforilar SMAD3, induzindo sua translocação nuclear e participar na transcrição dos genes responsivos ao TGF- β . Além de fosforilar SMAD3, a via JNK também fosforila a proteína C-Jun, aumentando o complexo com a proteína SMAD2 para a transcrição gênica (74). Portanto, transdutores de sinais não-SMAD fornecem uma regulação quantitativa da via de sinalização e permite com que haja uma via cruzada com outras principais vias de sinalização acionadas pelo TGF- β (75).

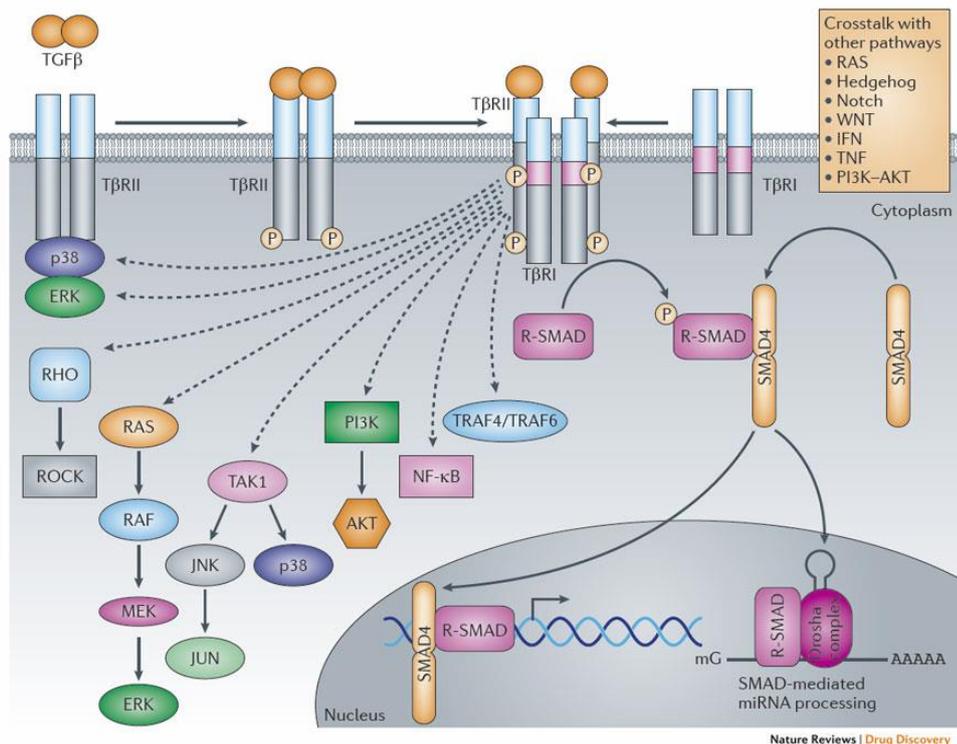


Fig 1.7 – Via clássica e alternativa de sinalização do TGF-β. Nas vias alternativas não canônicas, o complexo de receptor de TGF-β ativado transmite sinal através de outros fatores, tais como TRAF6, TAK1, p38 MAPK, RHO, fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) -Akt, ERK, JNK ou fator nuclear KB (NF-κB). A sinalização por TGF-β pode ser influenciada por outras vias além das vias clássica e alternativa do TGF-β. A interação entre o TGF-β e outras vias define a capacidade do TGF-β de propagar sinais específicos. (Akhurst & Hata, 2012 (65).

1.8.1 – TGF-β e a doença de Chagas.

Cerca de 30% dos pacientes infectados pelo *T. cruzi* progridem para a fase crônica da doença e desenvolvem fibrose no miocárdio. Dados revelam que pacientes cronicamente infectados apresentam cardiomiopatia, sendo diretamente relacionados com uma alta concentração de TGF-β no soro quando comparados com pacientes saudáveis. (76). Células como fibroblastos cardíacos, são os primeiros tipos celulares a sintetizar e secretar o TGF-β para o meio extracelular (77).

O TGF-β está envolvido no estabelecimento e desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica. Esta citocina participa do processo de invasão à célula hospedeira, uma vez que o *T. cruzi* necessita de receptores funcionais do TGF-β e sua via clássica de sinalização para invadir a célula hospedeira (78–80). Dados revelam que o nocaute dos receptores de TGF-β em células de mamíferos, TβRI e TβRII, impossibilitam o parasito de invadir a célula alvo (67). O *T. cruzi* utiliza TGF-β

na sua biologia. Formas tripomastigota e amastigota de diferentes cepas foram capazes de ativar diretamente o TGF- β latente (81), o que pode contribuir para o processo de invasão e a gênese da doença de Chagas. Além disso, a resposta imune do hospedeiro é controlada por TGF- β durante a infecção pelo *T. cruzi* (76,82,83). Evidências experimentais também mostram que o parasito induz a síntese do TGF- β em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos (84), o que pode influenciar a sobrevivência do parasita. Ainda, formas amastigotas captam TGF- β da célula hospedeira, utilizando-o para a diferenciação em tripomastigota, o que possibilita a continuidade no ciclo celular do parasito (85). Após sucessivas divisões, formas tripomastigotas e o TGF- β ativo são liberados no microambiente facilitando a invasão em células vizinhas através da associação do *T. cruzi* com o TGF- β na célula alvo (68).

Estudos utilizando modelos de cardiomiopatia chagásica experimental e ensaios clínicos demonstraram que o TGF- β participa também do processo de fibrose cardíaca na doença de Chagas. Níveis elevados de TGF- β associados com intensa fibrose do miocárdio foram detectados em camundongos nocaute em α 2-macrobulina infectados pelo *T. cruzi* (86) e em pacientes portadores da doença de Chagas com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (76). Relatos recentes descrevem que inibidores da sinalização de TGF- β reduzem a infecção e evitam o dano cardíaco e a fibrose durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* (77,87,88). Em conjunto, estas evidências demonstram um papel fundamental do TGF- β na infecção pelo *T. cruzi* e no desenvolvimento da doença de Chagas.

Além disso, dados do nosso grupo demonstram que cardiomiócitos altamente infectados pelo *T. cruzi* (72 e 96h de infecção) *in vitro* apresentam baixa expressão de fibronectina, enquanto células não infectadas adjacentes apresentam rede intensa deste componente de matriz extracelular similar ao controle (89) mesmo após tratamento com TGF- β (90). Embora o tratamento com TGF- β seja capaz de disparar aumento na expressão de componentes de matriz extracelular em cardiomiócitos não infectados, este efeito é dose dependente, sendo observado após o tratamento das culturas com altas concentrações de TGF- β (>10 ng/ml) (90). Visto que fibroblastos cardíacos são as células efetoras no processo de fibrose cardíaca, sendo os principais responsáveis pela síntese de matriz extracelular no miocárdio (91), e em linhagens originadas de músculo esquelético (mioblastos L6E9)

é possível detectar resposta ao tratamento com TGF- β em concentrações picomolares (92), avaliamos a expressão de componentes de matriz extracelular em fibroblastos cardíacos e células musculares esqueléticas (L6E9) normais e infectadas pelo *T. cruzi* após tratamento com diferentes concentrações de TGF- β , assim como analisamos os mecanismos de sinalização subjacentes à estes processos.

1.9 – JUSTIFICATIVA.

Apesar de esforços conjuntos na América Latina para erradicar a transmissão do *T. cruzi* por seus vetores triatomíneos, a doença de Chagas ainda apresenta uma prevalência da infecção de 8-10 milhões de pacientes com cerca de 3 milhões de casos sintomáticos. A doença produz perdas sociais importantes nas áreas endêmicas, em termos de mortalidade, absenteísmo, incapacidade laboral e custos médico-sociais, números geralmente ignorados por políticos e governos, tanto em virtude da evolução crônica e pouca visibilidade da doença como principalmente pela ausência de organização e pouca força política da população exposta ou afetada pelo mal (10,93) Muitos estudos têm abordado a fase aguda da doença de Chagas, no entanto, pouca atenção tem sido dada à fase crônica, quando o quadro de fibrose, que não possui tratamento eficaz, se instala. Além disso, poucos estudos enfocam a infecção do músculo esquelético, um dos locais de persistência do parasito na fase crônica da doença. Entre os raros relatos, Maldonado e colaboradores (62) mostram intensa degeneração de miofibras esqueléticas com sinais de regeneração envolvendo ativação de células satélite durante a infecção pelo *T. cruzi*. Em paralelo, linhagens de fibroblastos têm também sido tradicionalmente utilizadas como modelo de estudo da interação *T. cruzi*-célula hospedeira (94), mas o papel de fibroblastos cardíacos, considerados como células efectoras no processo de fibrose cardíaca (91), nunca foi estabelecido para a fibrose cardíaca na doença de Chagas. Assim, sabendo que o TGF- β está envolvido no estabelecimento e desenvolvimento da fibrose cardíaca (87), utilizamos o modelo de cultivo de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e de mioblastos esqueléticos tratados com esta citocina como ferramenta de estudo dos mecanismos subjacentes às alterações da matriz extracelular durante a infecção pelo *T. cruzi*, que ainda não se encontram completamente esclarecidos, buscando a identificação de novas moléculas alvo do processo de regulação da fibrose.

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Comparar a resposta de cardiomiócitos, fibroblastos e células musculares esqueléticas frente ao estímulo de TGF- β durante a infecção pelo *T. cruzi*, analisando os mecanismos de sinalização envolvidos neste processo.

2.2- Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito da infecção pelo *T. cruzi* na distribuição e expressão de MEC em fibroblastos cardíacos e células de músculo esquelético, comparando com a resposta de cardiomiócitos em modelos *in vitro* de infecção pelo *T. cruzi*.
- II. Examinar a resposta de fibroblastos e mioblastos esqueléticos, infectadas ou não com *T. cruzi*, na síntese de MEC após estímulo com TGF- β , comparando com cardiomiócitos.
- III. Analisar o papel da via de sinalização clássica e alternativa de TGF- β no remodelamento de MEC em cardiomiócitos, fibroblastos e mioblastos esqueléticos infectados ou não pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

CULTURA PRIMÁRIA

Células musculares cardíacas foram obtidas de embriões de camundongos com 18 dias de gestação (95). As fêmeas grávidas foram submetidas à eutanásia em câmara mortuária contendo dióxido de carbono (CO₂) e fixadas na placa de contenção (placas de cortiça) com a região ventral voltada para cima. Após assepsia com álcool 70%, a pele foi removida expondo a cavidade peritoneal. O útero contendo os embriões foi retirado e transferido para placa de Petri contendo solução de Ringer (NaCl 154 mM, KCl 3,35 mM, CaCl₂ 1,7 mM, pH 7,0). Dentro da cabine de segurança biológica, os embriões foram decapitados e seus corações removidos. Os átrios foram separados dos ventrículos, e apenas os ventrículos foram então fragmentados. O tecido fragmentado foi lavado em solução PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM, Na₂HPO₄ 6,4 mM, pH 7,2) e submetido à dissociação enzimática seqüencial (solução PBS contendo tripsina 0,025% e colagenase 0,01%). As células isoladas foram quantificadas em câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 1,5 x 10⁵ células/ poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro; 10⁶ células/ poço em placas de 6 poços ou garrafas de 25 - 75 cm². Todos os frascos e placas foram previamente revestidos com gelatina 0,01%. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 8% de soro fetal bovino (SFB), 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (penicilina). O meio nutritivo foi trocado a cada 2 dias. Todos os protocolos que envolvem o manuseio de animais experimentais receberam aprovação do CEUA (registro LW-37/13).

CULTURA DE FIBROBLASTOS CARDÍACOS

Fibroblastos cardíacos (FC) foram purificados a partir de sucessivas passagens de culturas primárias de cardiomiócitos semeadas em frascos de cultura de 75 cm². Inicialmente foi realizado o revestimento dos frascos de cultura de 75cm² com gelatina 0,01% por 15 minutos à 4°C na geladeira; e em seguida a gelatina foi removida e o frasco de cultura foi secado na estufa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 15 minutos. A expansão e purificação dos fibroblastos cardíacos foram realizadas pela dissociação enzimática de culturas confluentes com solução de

tripsinização (0,0025% de Tripsina, 0,01% de EDTA em PBS). Cardiomiócitos possuem adesão mais lenta que os FC. Assim, após 15 min de adesão na estufa, os cardiomiócitos não aderidos foram removidos com a retirada do sobrenadante, enquanto fibroblastos continuaram aderidos, constituindo purificação por adesão diferencial. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 8% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (penicilina) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Os cardiomiócitos remanescentes não resistem a sucessivas passagens, enquanto os FC se proliferam. Assim, os FC foram utilizados após a 5ª passagem de dissociação. Após a purificação de FC, foi realizada a dissociação enzimática e as células isoladas foram quantificadas em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. Em seguida, as células foram semeadas na densidade de 5x10⁴ células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e 5x10⁵ em placa de 6 poços com 35mm² mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (penicilina) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, para realização de ensaios experimentais.

CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES

As linhagens L6E9, uma linhagem de mioblastos obtida de músculo esquelético de ratos (ATCC CRL-1458) e células Vero, proveniente de rim de macaco verde (ATCC CCL-81), foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e 1 mM de L-glutamina para L6E9 e em meio RPMI com 10% SFB para células Vero, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A depender do tipo celular, a faixa fisiológica do TGF-β varia de 20-100pg/ml (96). A expansão das culturas confluentes foi realizada pela dissociação enzimática em PBS contendo tripsina 0,0025% e EDTA 0,01%, pH 7,2. As células L6E9 isoladas foram quantificadas em câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 5x10⁴ células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, ou em placas de Petri de 35 mm na densidade de 5x10⁵ células/ placa e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB e 1 mM de L-glutamina para realização dos ensaios. As células Vero foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² e foram utilizadas para obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

PARASITAS E INFECÇÃO DAS CULTURAS

Foram utilizadas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, derivadas de células Vero. O sobrenadante de culturas de Vero infectadas com a cepa Y 5-6 dias após a infecção, contendo tripomastigotas liberados, foi recolhido em tubos Falcon de 50mL. Os tubos contendo *T. cruzi* foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos à 4°C. Em seguida, os parasitos foram ressuspensos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (penicilina). Foi feita uma diluição de 1:100 para contagem dos parasitos na câmara de Neubauer. Células musculares cardíacas, FC e linhagens de mioblastos (L6E9) foram infectados numa multiplicidade de infecção de 10 parasitos/ célula hospedeira (10:1) após 24h de cultivo. A infecção foi interrompida após 72h.

TRATAMENTO DE CARDIOMIÓCITOS, FIBROBLASTOS E MIOBLASTOS L6E9 COM TGF- β

Ensaio para análise de proteínas de matriz extracelular.

Culturas normais e infectadas foram lavadas em solução de Ringer para remover o SFB contido no meio. O tratamento foi realizado nesse estudo com TGF- β recombinante (R&D) foi diluído em DMEM suplementado com 0,1% SFB, 2,5 mM de CaCl₂ e 2% L-glutamina para tratamento de FC e DMEM suplementado com 0,1% SFB e 2% L-glutamina para mioblastos L6E9. O TGF- β foi adicionado nas culturas com concentrações de 1, 5, 10 e 15 ng/ml após 24h de infecção. O tratamento com a citocina foi realizado por 48h. As culturas foram processadas para imunofluorescência indireta ou *western blot* para visualização e detecção de fibronectina como detalhado a seguir.

Ensaio para análise de proteínas da via de sinalização de TGF- β

Culturas normais e infectadas foram lavadas em solução de Ringer para remover o SFB contido no meio. Após 72h de infecção, antes do tratamento com o TGF- β , SB431542 (inibidor de ALK5, receptor do TGF- β) e SB203580 (inibidor da via de p38 MAPK), ambos numa concentração de 10 μ g/mL foram adicionados por 1h às culturas de FC e mioblastos L6E9, previamente ao tratamento com a citocina. Em

seguida, o TGF- β foi adicionado nas culturas com concentrações de 1, 5, 10 e 15 ng/ml por 1h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O tratamento foi realizado com TGF- β recombinante (R&D) diluído em DMEM suplementado com 0,1% SFB, 2.5 mM de CaCl₂ e 2% L-glutamina para tratamento de FC e DMEM suplementado com 0,1% SFB e 2% L-glutamina para mioblastos L6E9. As culturas foram então processadas para *western blot* para detecção de proteínas da via de sinalização do TGF- β , tanto da via clássica quanto da via alternativa, como detalhado a seguir.

IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

As culturas de cardiomiócitos, mioblastos L6E9 e FC, normais ou infectados com *T. cruzi* cepa Y após 72h de infecção, tratados ou não com TGF- β , foram fixadas por 5 min a temperatura ambiente em paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS, e lavadas em PBS. Para bloquear reações inespecíficas, as lamínulas foram lavadas (3 X 20 min) com PBS + 4% BSA. As células foram então incubadas por 18hs à 4°C com anticorpo anti-fibronectina (Sigma Chemical Co.: 1/400). Após sucessivas lavagens em PBS, as culturas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado a TRITC (Sigma, 1/200) por 1h à 37°C. Para visualização do núcleo, as células foram coradas com 10 μ g/ml de 4', 6- diamidino-2-phenilyndole (DAPI – corante de DNA) por 5 min protegidos da luz e, em seguida, as lamínulas foram montadas em 2,5% de 1'4-diazabicyclo-(2.2.2)-octane (DABCO; Sigma Chemical Co.) em PBS/ 50% de glicerol, seladas com esmalte e as imagens adquiridas ao microscópio de fluorescência Zeiss Axioimager M1 equipado com Apotome ou microscópio confocal de escaneamento a laser Zeiss LSM 510 Meta.

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Cardiomiócitos, FC e mioblastos L6E9, normais ou infectados com *T. cruzi* cepa Y após 72h de infecção, tratados ou não com TGF- β , foram lavadas por 3 vezes com PBS a 4°C, com as placas também sobre gelo. Em seguida, as células foram raspadas em 150 μ l de tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, pH 8.0) contendo coquetéis de inibidores de fosfatases (Sigma Chemical Co.; Cantharidin, (-)-p-Bromolevamisole oxalate e Calyculin A) e de proteases (Sigma Chemical Co.; AEBSF – [4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoridehydrochloride, aprotinina, hidrocloreto de bestatina, E-64-[N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate salt,

Pepstatin A). Alíquotas de 20 µL foram previamente separadas de cada amostra para dosagem de proteínas pelo método de Folin-Lowry. Ao restante dos extratos, foi adicionado tampão de amostra 5X (0,3 M Tris, 10% SDS, 0,125% Azul de Bromofenol, 25% β-mercaptoetanol, 50% Glicerol) e as amostras foram fervidas em banho seco à 100°C por 5 minutos logo após a extração, para inativação completa de proteases e fosfatases. Todos os extratos foram armazenados a -20°C.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi realizada em duplicata para cada amostra, com 5 e 10 µl do lisado celular sendo diluídos em água milliQ q.s.p. 200µl em tubos eppendorf de 1,5ml. Paralelamente, 10, 20, 30, 40 e 50 µl de solução de BSA 1mg/ml também foram diluídos da mesma forma para a realização da curva padrão. Foi então adicionado a cada amostra 1ml de solução reativa (0,4% hidróxido de sódio, 2% carbonato de sódio, 0,02% de tartarato de sódio, 0,01% sulfato de cobre). Após agitação em vortex, os tubos foram incubados por 10 min a temperatura ambiente e 100 µl do reagente Folin Ciolcalteus (Merck) diluído 1:3 adicionado posteriormente. Os tubos foram novamente agitados em vortex e incubados por 30min a temperatura ambiente. Neste tempo de incubação, as proteínas contidas na amostra reduzem o reagente de Folin tendo o cobre como catalisador, formando um composto colorido que absorve luz linearmente à concentração de proteínas. Como controle negativo, 200 µl de água foram submetidos a todos o processo, e considerado como “branco” da reação. A absorbância dos compostos formados pelas amostras foi lida utilizando-se cubetas de quartzo em espectrofotômetro Genequant 1300 (G&E Healthcare) em $\lambda=617$ nm. A partir dos pontos da curva padrão, feitos com quantidades conhecidas de proteína, foi calculada a constante N, que equivale a absorbância de 1µg de proteína. Para determinação da concentração de proteínas em cada amostra, aplicamos a fórmula:

$$\text{Concentração em } \mu\text{g}/\mu\text{l da amostra} = \frac{(\text{Absorbância obtida na leitura} / N)}{\mu\text{l do lisado usados na dosagem}}$$

WESTERN BLOT

Após dosagem de proteínas, proteínas totais obtidas de extratos de culturas de fibroblastos e mioblastos L6E9 normais e infectados, tratados ou não com TGF-β foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando 10µg de proteína

no gel de 10% para detecção de FN e 20-40 µg de proteína no gel de 12% contendo SDS (SDS-PAGE) para detecção de proteínas fosforiladas. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com tampão de bloqueio para fibronectina (TBS, 5% de leite desnatado (Molico), 0,1% de Tween 20) ou para proteínas da via de sinalização de TGF-β (TBS, 1%BSA, 0,1% Tween 20) por 1h na temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-FN diluído 1:5000 (Sigma Chemical Co.), anticorpo anti-SMAD 2 fosforilada (Millipore, 1:2000), anti-p38 fosforilada (Cell Signaling, 1:1000), anti-p-c-JNK (Cell signaling, 1:500) incubado por 18h à 4°C. As membranas foram então lavadas e, em seguida, incubadas por 1 h a temperatura ambiente com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo conjugados a peroxidase (Pierce Biotechnology), diluídos 1:20.000 em tampão de bloqueio. Anticorpo anti GAPDH 1:50.000 (RDI Fitzgerald) foi utilizado como controle interno. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS + 0,1%Tween20 3X10 min e a revelação da peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit Super Signal West Pico (Pierce Biotechnology). A densitometria das bandas resultantes foi realizada com o programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Os valores de densitometria foram normalizados, sendo calculado o índice de variação (I.V.) quando o controle não tratado e não infectado=1.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar valores obtidos das densitometrias das análises de *western blot*, foi realizado o teste t de Student para análise estatística. $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Pelo menos 3 experimentos independentes de cada parâmetro foram realizados.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Expressão de fibronectina em mioblastos esqueléticos L6E9 normais e infectados com *T. cruzi* e tratados com TGF- β .

Para analisar a expressão de FN na matriz extracelular com resultados quantitativos, extratos celulares de mioblastos L6E9 normais e infectados com *T. cruzi*, tratados com TGF- β por 48h, foram obtidos e submetidos à detecção desta proteína de MEC por *western blot*. Em culturas de mioblastos L6E9 normais, a adição de 1ng/ml de TGF- β resultou em aumento significativo na expressão de FN na matriz quando comparados com a cultura controle. O aumento de FN em mioblastos L6E9 ocorreu de forma dose dependente quando tratados com concentrações maiores de TGF- β , 5ng/ml e 10ng/ml, sendo esse aumento estatisticamente significativo quando comparados com cultura não infectada sem tratamento (Fig.4.1).

Em culturas infectadas com *T. cruzi* e tratadas com TGF- β , o resultado obtido frente à expressão de FN foi distinto quando comparado com a cultura normal tratada. Mioblastos L6E9 infectados sem tratamento apresentaram uma redução na expressão de FN na matriz extracelular. Mesmo com o tratamento com diferentes concentrações (1-10ng/ml) de TGF- β , a expressão de FN nessas culturas tratadas e infectadas encontrou-se significativamente reduzida com seus pares normais tratados (Fig. 4.1). No entanto, ao comparar somente as culturas infectadas, pode-se observar que mioblastos são moderadamente responsivos ao TGF- β , uma vez que a adição desta citocina estimula a síntese de FN nas culturas infectadas quando comparadas com infectado não tratado (Fig. 4.1).

Figura 4.1. Expressão de fibronectina em mioblastos esqueléticos L6E9 normais e infectados com *T. cruzi* tratados com TGF- β . Em culturas normais, o tratamento com 1ng/ml de TGF- β por 48h dispara aumento na expressão de FN em L6E9, e esse aumento é observado de forma dose dependente depois da adição de 5 e 10ng/ml de TGF- β . Em mioblastos L6E9 infectados com *T. cruzi* (72h de infecção), tratados com TGF-beta (1-10ng/ml), é observado um aumento na expressão de FN quando comparados com cultura infectada não tratada porém ocorre uma redução na expressão de FN quando comparados com culturas não infectadas, mesmo após o tratamento com TGF- β (1-10ng/ml). * $p \leq 0,05$ quando comparados com pares não infectados; # $p \leq 0,05$ quando comparados com controle não tratado e não infectado; N=4.

Expressão de fibronectina em Mioblastos esqueléticos (L6E9)

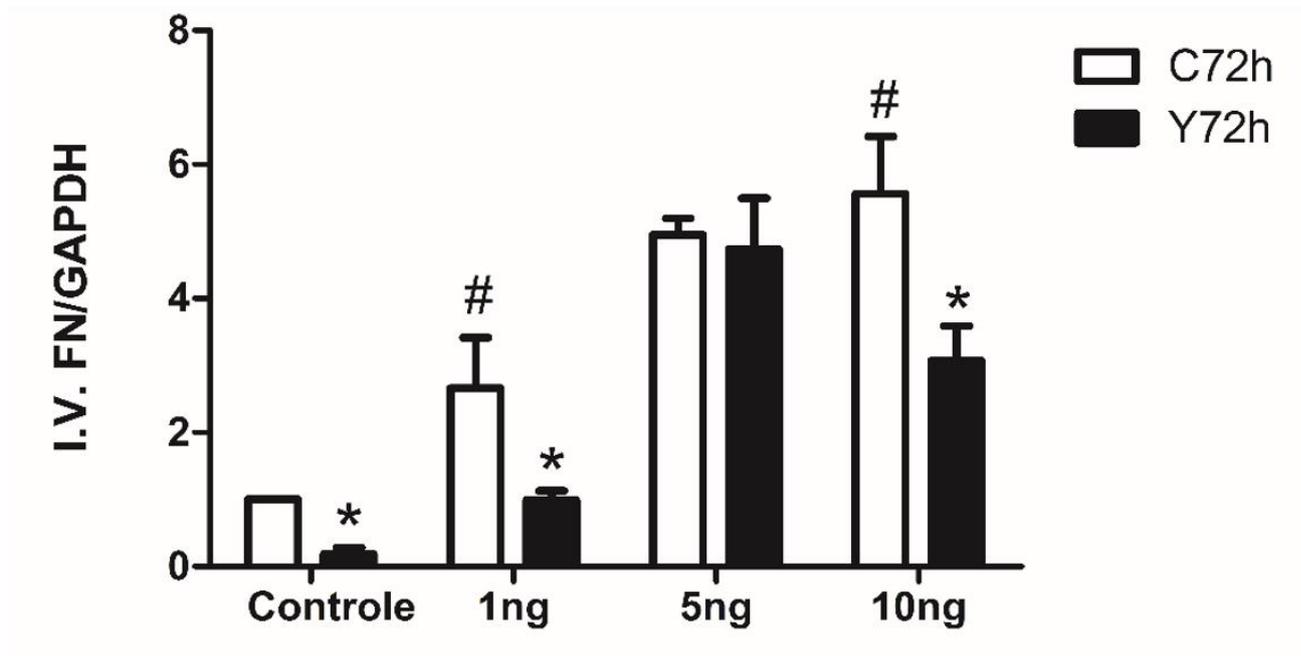
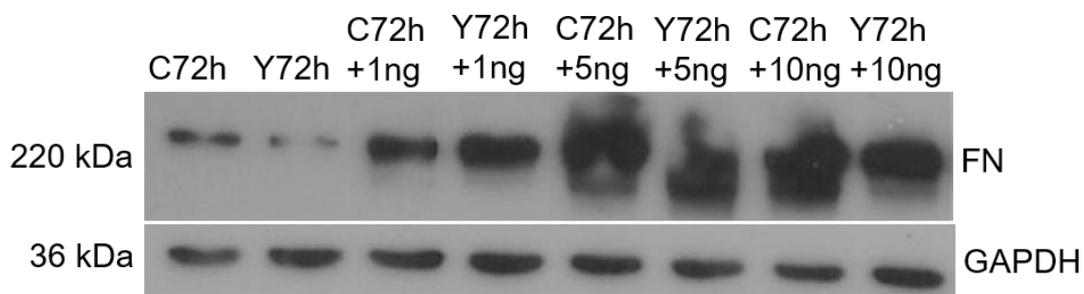


FIGURA 4.1

4.2 – Caracterização de fibroblastos cardíacos.

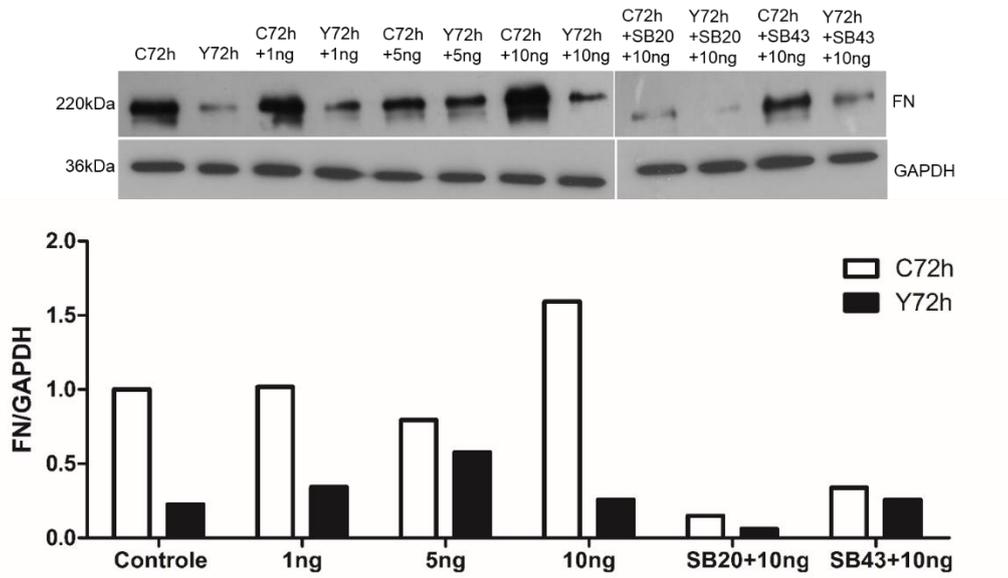
Fibroblastos cardíacos possuem núcleo celular maior que CM, assim como morfologia característica distinta destas células, e inicialmente a purificação de FC a partir de culturas de cardiomiócitos era avaliada somente por morfologia. Assim, durante os ensaios iniciais, células obtidas após 3ª passagem de culturas de CM foram infectados com *T. cruzi*, tratadas com TGF- β por 48h e submetidas a *western blot* para analisar a expressão de FN sob essas condições. Nossos dados revelaram que aumento na expressão de FN só é observado após a adição de 10ng/ml de TGF- β . Além disso, culturas de 3ª passagem de CM apresentaram redução na expressão de FN quando comparado com seu controle normal, mesmo após a adição de TGF- β . A adição dos inibidores SB431542 e SB203580 (inibidor da via de SMADS e p38 MAPK respectivamente) nestas culturas levou a uma inibição do estímulo de FN por TGF- β , uma vez que culturas normais e infectadas tratadas com 10ng/ml de TGF- β (48h) apresentaram reduzida expressão de FN após pré-tratamento com os inibidores de sinalização (Fig 4.2A). Dados publicados do nosso grupo revelaram que em cardiomiócitos normais e infectados tratados com TGF- β , somente com 10ng/ml foi visualizado um aumento na expressão de FN na superfície celular, com redução significativa na expressão de FN na matriz extracelular após infecção pelo *T. cruzi*, quando comparados com seu par normal tratado com 10ng/ml (97). Os dados obtidos de FN em extratos de culturas de 3ª passagem de CM corroboram com resultados de cardiomiócitos, sugerindo que a purificação de FC não estava adequada e a resposta de FN apresentada poderia não ser propriamente de FC mas sim de CM presentes na cultura, sugerindo que análises morfológicas realizadas ao microscópio não garantem boa purificação de FC.

Assim, para avaliar o grau de purificação de FC obtidos de culturas de CM, foi realizada detecção de desmina, proteína de citoesqueleto específica de cardiomiócitos, em extratos de FC após diferentes passagens. Extratos de FC obtidos na 3ª e 4ª passagem revelaram que ainda há presença de cardiomiócitos nas culturas de FC, já que os extratos ainda apresentavam alta expressão de desmina, demonstrando que essas passagens não são viáveis para realização de ensaios experimentais. Culturas puras de FC foram obtidas somente a partir da 5ª passagem de culturas de CM, com a ausência de cardiomiócitos demonstrada pela

ausência de marcação para desmina, e todos os resultados assinalados como referentes a fibroblastos cardíacos correspondem a culturas a partir da 5ª passagem sem detecção de desmina (Fig.4.2B).

Figura 4.2 – (A) Expressão de FN em células obtidos na 3ª passagem de cultura de CM. Culturas controle mostram estímulo de FN somente a partir do tratamento com 10 ng/ml de TGF- β (48h). Doses de 1ng/ml e 5ng/ml não foram capazes de induzir aumento de FN. A infecção pelo *T. cruzi* leva a uma redução na expressão de FN mesmo após adição de TGF- β . A ação de inibidores da via de SMADs e p38 MAPK impede aumento na expressão de FN mesmo após estímulo de 10 ng/ml. Esses resultados obtidos com extratos de células após 3ª passagem de cultura de CM são semelhantes a dados publicados anteriormente em culturas de cardiomiócitos sob as mesmas condições. **(B) Caracterização da cultura de fibroblastos cardíacos.** Grau de purificação de FC a partir de culturas de cardiomiócitos (CM). O grau de purificação de FC foi avaliado pela detecção de desmina nos extratos celulares obtidos na 3ª, 4ª e 5ª passagem. Boa purificação de FC foi obtida a partir da 5ª passagem como mostrada pela ausência de desmina. Culturas obtidas de passagens anteriores ainda apresentam desmina demonstrando a presença de cardiomiócitos.

A



B

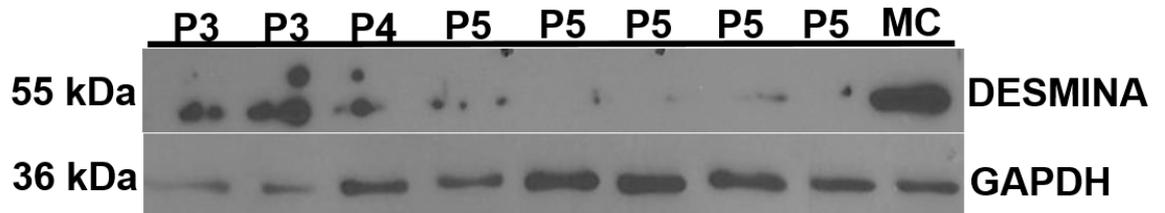


Figura 4.2

4.3 – Expressão de fibronectina em culturas de fibroblastos cardíacos normais e infectados com *T. cruzi* tratados com TGF- β .

Em culturas de FC normais e infectados, tratadas com TGF- β por 48h, foi avaliada a expressão de FN na matriz extracelular por *western blot*. Uma vez que grande variação nos níveis de FN foi inicialmente detectada, e variações no grau de infecção da cultura também foram visualmente observadas antes do processo de extração de proteínas, o nível de infecção pelo *T. cruzi* foi quantificado através da expressão de BiP específica de *T. cruzi*, reconhecida com anticorpo desenvolvido contra BiP de *T. brucei* que não reage com a enzima de mamíferos (gentilmente cedido pelo Dr. James Bangs, University of Wisconsin). Com isso, os extratos foram separados de acordo com os níveis de infecção para poder visualizar e entender a expressão de FN nessas culturas normais e infectadas tratadas com TGF- β .

A figura 4.3A mostra uma cultura de FC altamente infectada pelo *T. cruzi* como indicada pela alta expressão de BiP_{Tb}, com valores de densitometria de BiP_{Tb}/GAPDH de mamíferos duas vezes maiores que o grupo de baixa infecção (razão >4; Fig. 4.3A). Culturas de FC normais tratadas com TGF- β (1-10ng/ml), apresentaram aumento de FN na matriz extracelular a partir de 1ng/ml, quando comparados com o controle. Com a administração de doses maiores de TGF- β , 5ng/ml e 10ng/ml, o aumento na expressão de FN também foi maior, mas não dose-dependente, mostrando pico de expressão de FN em 5 ng/ml de TGF- β . Nestas culturas de FC com alto grau de infecção, a expressão de FN encontrou-se aumentada após a infecção, quando comparados com culturas normais de FC. Após o tratamento com TGF- β (1-10ng/ml) em culturas de FC altamente infectadas, a expressão de FN encontrou-se reduzida quando comparadas com seus pares normais tratados (Fig. 4.3B).

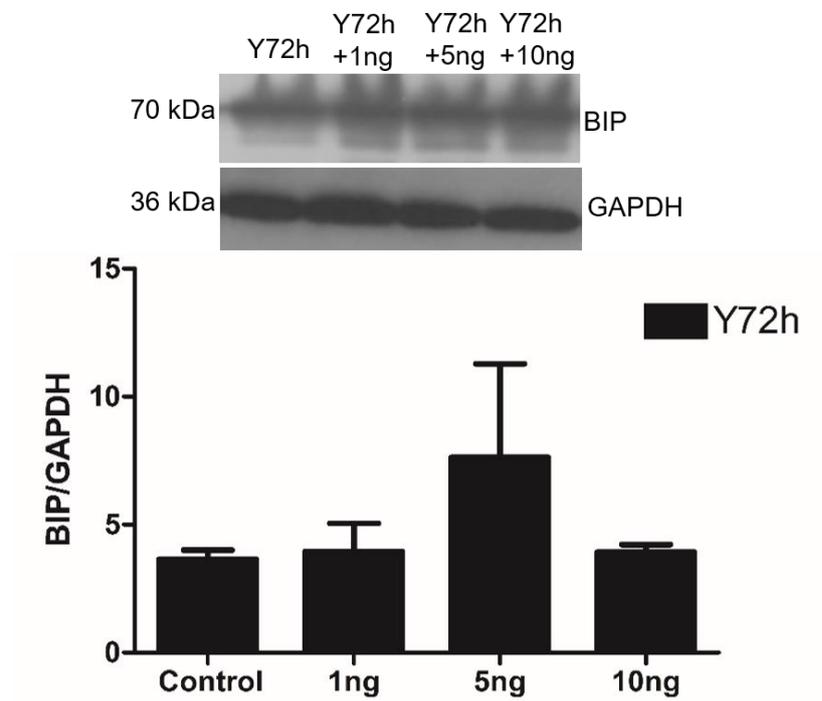
Em outras partidas de culturas de FC, o grau de infecção encontrava-se reduzido quando comparadas com o grupo anterior, apresentando valores de densitometria de BiP_{Tb}/GAPDH de mamíferos <2, ou duas vezes menores que o grupo de alta infecção (Fig. 4.3C). As culturas de FC normais, tratadas com TGF- β (1-10ng/ml), responderam ao estímulo da citocina de forma semelhante às anteriores, com aumento na expressão de FN apresentando um pico em 5 ng/ml de TGF- β . Em culturas de FC que apresentaram um baixo grau de infecção, foi

observada uma redução na expressão de FN quando comparados com seu par normal. Após o tratamento com TGF- β nessas culturas com baixa infecção, o tratamento não teve efeito mesmo com doses altas de TGF- β , apresentando uma redução na expressão de FN na superfície celular (Fig. 4.3D).

Figura 4.3 – Expressão de fibronectina em culturas de fibroblastos cardíacos com alto grau de infecção. (A) Expressão de BiP_{Tb} em culturas de FC infectadas. O aumento na expressão de BiP_{Tb} em culturas de FC infectadas indica alto grau de infecção neste tipo celular. Culturas que apresentaram valores de densitometria de BiP/GAPDH de mamíferos >4 foram considerados como culturas com alta infecção. (B) Expressão de FN em culturas de FC com alto grau de infecção. Culturas normais de FC tratadas com TGF- β (1-10ng/ml), apresentam um aumento na expressão de FN de acordo com as doses administradas, com pico de FN após tratamento com 5 ng/ml de TGF- β . Em culturas de FC infectadas, ocorre um aumento na expressão de FN quando comparadas com seus pares normais. FC infectados e tratados com TGF- β (1-10ng/ml) apresentam uma redução na expressão de FN mesmo com doses elevadas de TGF- β . * $p \leq 0,05$ quando comparados com pares não infectados, N=3.

A

Expressão de BIP em Fibroblastos cardíacos

**B**

Expressão de Fibronectina em Fibroblastos cardíacos

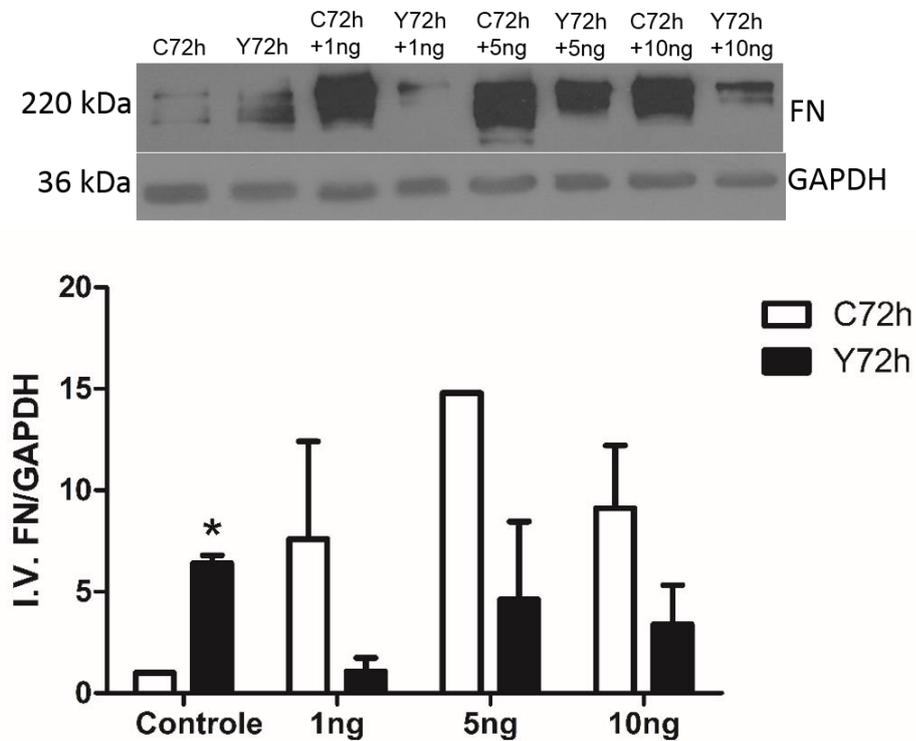
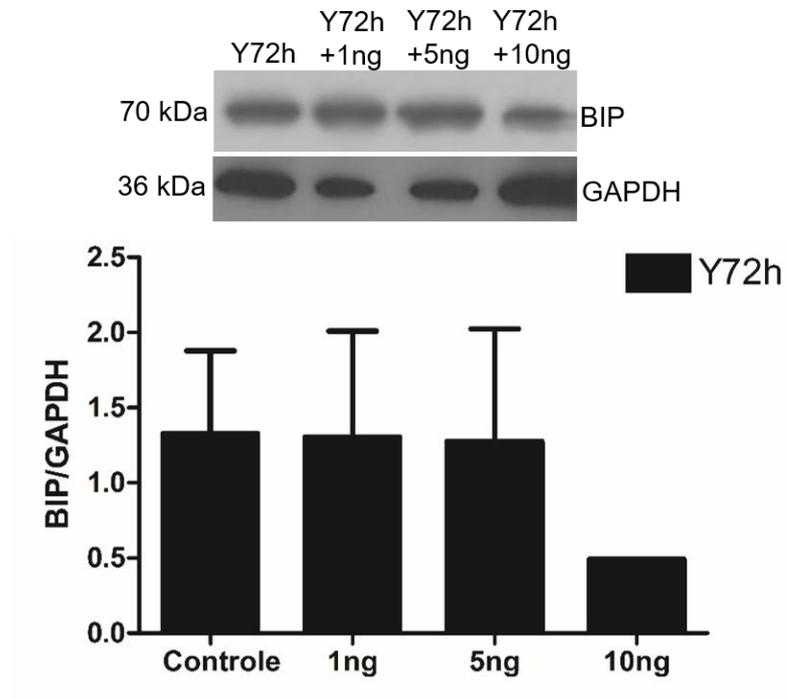


FIGURA 4.3

Figura 4.3 – Expressão de fibronectina em culturas de fibroblastos cardíacos com baixo grau de infecção. (C) Expressão de BiP_{Tb} em culturas de FC com baixo grau de infecção. A baixa expressão de BiP_{Tb} observada em culturas de FC infectadas caracteriza baixo grau de infecção neste tipo celular (assinalados a partir de valores de densitometria de BiP/GAPDH de mamíferos <2, duas vezes menores que o grupo de alta infecção). (D) Culturas normais de FC, tratadas com TGF- β (1-10 ng/ml), responderam ao estímulo da citocina com aumento na expressão de FN de forma semelhante às anteriores, com pico de FN após tratamento com 5 ng/ml de TGF- β . Nessas culturas de FC, observa-se uma redução na expressão de FN após a infecção pelo *T. cruzi*, quando comparadas com seu par controle normal. Culturas com baixo grau de infecção, e tratadas com TGF- β (1-10ng/ml) apresentaram uma redução na expressão de FN mesmo após tratamento com doses elevadas de TGF- β . * $p \leq 0,05$ quando comparados com pares não infectados; # $p \leq 0,05$ quando comparados com controle não tratado, N=3.

C

Expressão de BIP em Fibroblastos cardíacos



D

Expressão de Fibronectina em Fibroblastos cardíacos

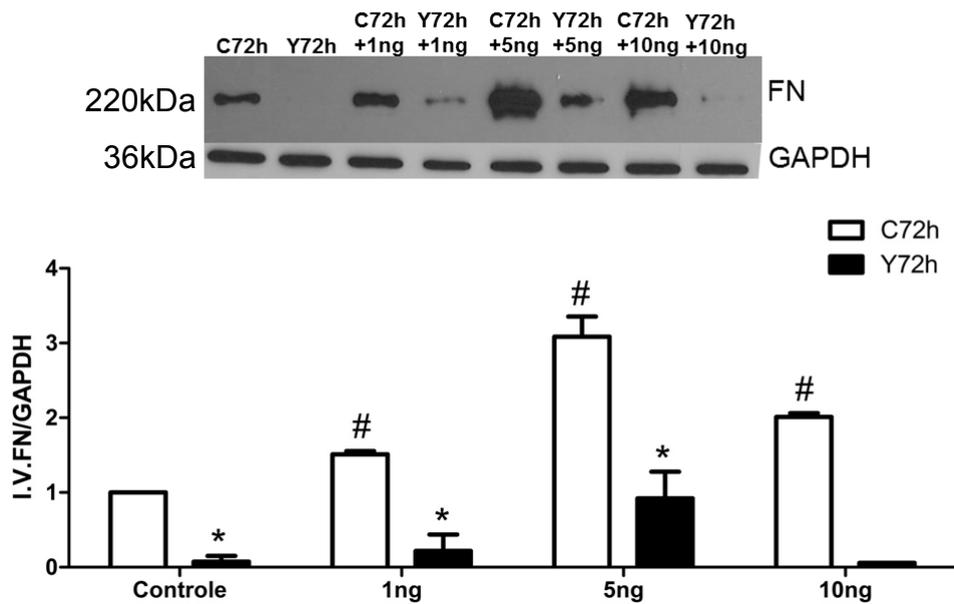


FIGURA 4.3

4.4– Distribuição espacial de fibronectina em culturas de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e mioblastos esqueléticos L6E9 na matriz extracelular.

Para confirmar os dados de western blot e visualizar a distribuição espacial de FN na matriz extracelular, culturas de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos (FC) e mioblastos L6E9 foram tratadas com diferentes concentrações de TGF- β (1-10ng/ml) por 48h e processadas para imunofluorescência indireta. A microscopia confocal revelou uma distribuição característica de rede de fibrilas de FN na superfície celular de cardiomiócitos (Fig.4.4A). Quando essas culturas foram tratadas com 1ng/ml (Fig. 4.4B) e 5ng/ml (Fig. 4.4C), não houve alteração na distribuição de FN na matriz extracelular, que apresentaram características similares a cultura controle. No entanto, o estímulo de cardiomiócitos com 10ng/ml de TGF- β (Fig. 4.4D) resultou um aumento na espessura das fibrilas de FN na matriz extracelular.

Culturas de mioblastos L6E9 (Fig. 4.4E) e FC (Fig. 4.4L) não infectadas, apresentaram comportamento similar quando tratados com TGF- β , mas distinto da resposta observada em cardiomiócitos. A partir da adição de 1ng/ml em mioblastos L6E9 (Fig. 4.4F) e FC (Fig. 4.4J), foi observado um aumento na intensidade de marcação da FN na superfície celular. Esse aumento foi dose dependente, com fibrilas espessas de FN sendo observadas após o tratamento das culturas com 5ng/ml de TGF- β (Fig. 4.4G - mioblastos L6E9; Fig. 4.4K - FC) e com 10ng/ml desta citocina (Fig. 4.4H - mioblastos L6E9; Fig. 4.4L – FC) quando comparados com culturas controle não tratados.

4.5 – Efeito da infecção pelo *T. cruzi* na matriz de fibronectina de fibroblastos cardíacos e mioblastos L6E9 tratados com TGF- β .

Em culturas de fibroblastos cardíacos e mioblastos L6E9, foram avaliados o perfil de distribuição de FN na matriz extracelular nessas culturas infectadas com *T. cruzi* e tratadas com TGF- β por 48h. Culturas de mioblastos L6E9 sem tratamento com a citocina, apresentaram uma redução na distribuição de FN na matriz extracelular em células infectadas com *T. cruzi*, como visualizado pela ausência de marcação nas áreas infectadas mostradas por DIC (Fig.4.5A-B). Culturas controle de FC apresentaram comportamentos similares a mioblastos L6E9 frente à infecção,

com uma redução na distribuição de FN na superfície celular (Fig. 4.5 I-J). Com a adição de 1ng/ml de TGF- β em mioblastos L6E9 (Fig. 4.5C-D) e em FC (Fig. 4.5K-L), observa-se que não houve efeito da ação da citocina especificamente nas células infectadas, que continuam apresentando reduzida marcação para FN. Mesmo doses maiores de TGF- β , como 5ng/ml (L6E9 - Fig. 4.5 E-F; FC - Fig. 4.5M-N) e 10ng (L6E9 - Fig. 4.5G-H; FC - O-P) não foram capazes de disparar um aumento de FN nas células infectadas. Um aumento na intensidade de marcação de FN é visualizado em células adjacentes não infectadas das culturas de mioblastos L6E9 e FC, que responderam ao estímulo da citocina de forma dose dependente, de acordo com a concentração adicionada.

Figura 4.4 – TGF- β modula FN diferencialmente em cardiomiócitos, mioblastos L6E9 e fibroblastos cardíacos não infectados. (A) Cardiomiócitos normais mostram fibrilas de FN em sua superfície. A adição de 1ng/ml ou 5ng/ml de TGF- β não altera a expressão de FN em cardiomiócitos normais (B-1ng/ml; C- 5 ng/ml). Somente 10 ng/ml de TGF- β induz expressão de FN aumentada (D). Em contraste, mioblastos L6E9 (F) e fibroblastos cardíacos (J) já apresentam um estímulo de matriz de FN após tratamento com 1ng/ml de TGF- β , quando comparado com culturas não tratadas (L6E9-E; FC-I). FN aumentada ainda é detectada nesses dois tipos celulares com a adição de 5ng/ml (L6E9-G; FC-L) ou 10 ng/ml (L6E9-H; FMC-M) de TGF- β . Os tratamentos com a citocina foram realizados por 48h. Barra = 20 μ m.

TGF- β (ng/ml)

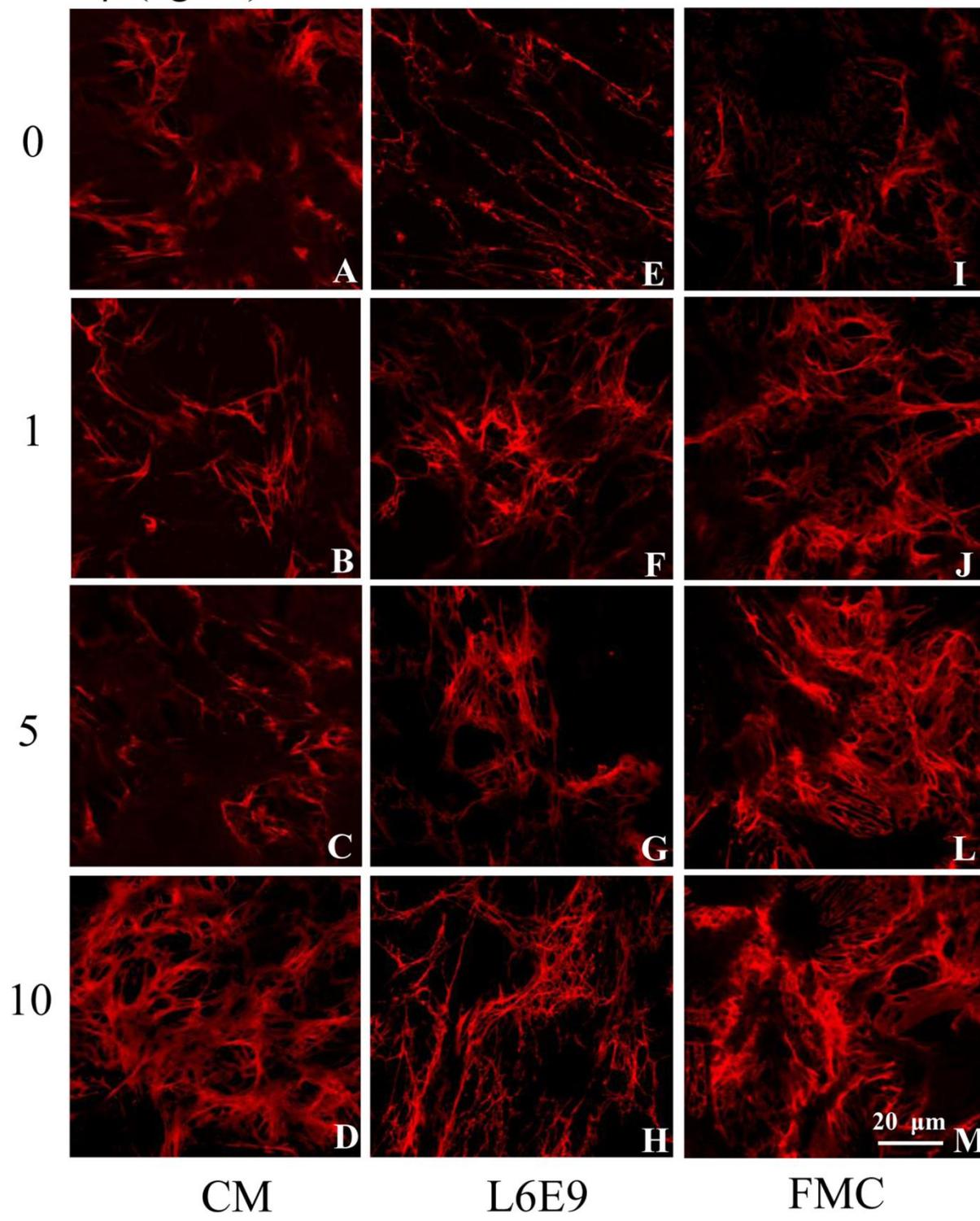
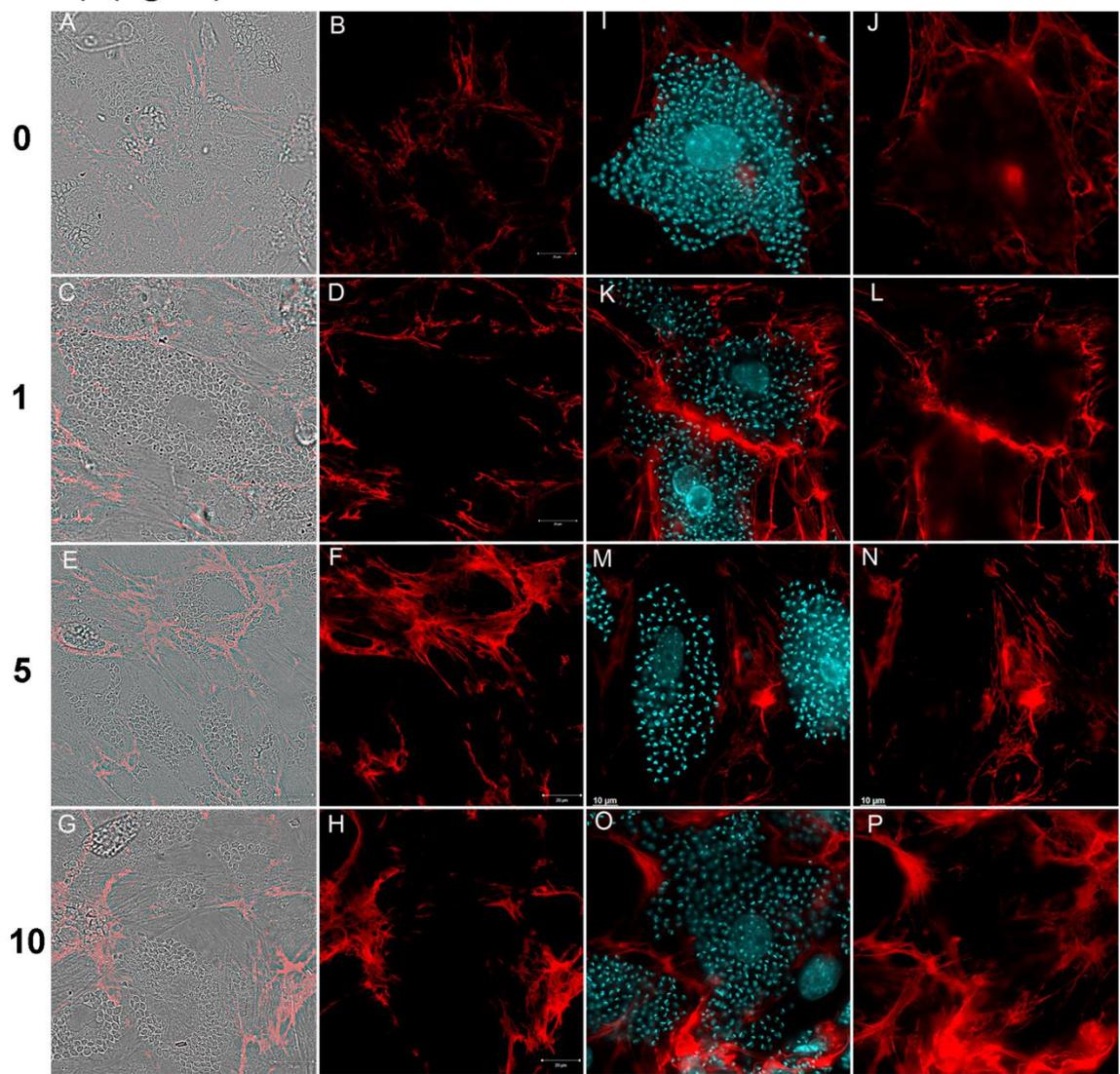


Figura 4.5 – Imunomarcção de fibronectina em fibroblastos cardíacos e mioblastos L6E9 infectados com *T. cruzi* e tratados com TGF- β . (A-H) Mioblastos L6E9 e (I-P) fibroblastos cardíacos apresentam expressão reduzida de FN após 72h de infecção com *T. cruzi* em áreas contendo células que apresentam alto número de parasitas intracelulares. O tratamento de culturas de fibroblastos cardíacos e de mioblastos L6E9 infectados com 1ng/ml (L6E9, C-D; FC, K-L), 5 ng/ml (L6E9, E-F; FC, M-N) ou 10 ng/ml (L6E9, G-H; FC, O-P) de TGF- β induz um aumento na expressão de FN somente em áreas não infectadas da cultura. DAPI (azul) foi utilizado para marcar o núcleo da célula hospedeira e o núcleo e o cinetoplasto dos parasitas intracelulares. Os tratamentos com a citocina foram realizados por 48h. Barra = 20 μ m.

TGF- β (ng/ml)



4.6 – Detecção de SMAD 2 fosforilada (PS2) em culturas de fibroblastos cardíacos e mioblastos esqueléticos comparados com cardiomiócitos tratados com TGF- β .

Culturas não infectadas de FC obtidas na 5ª passagem e mioblastos L6E9 tratados por 48h com TGF- β (1-10ng/ml), apresentaram aumento na expressão de FN já a partir do estímulo de 1ng/ml, em contraste com cardiomiócitos que só apresentam aumento após tratamento com concentrações maiores que 10 ng/ml. Assim, vias de sinalização do TGF- β podem estar participando diferencialmente na modulação de componentes de matriz extracelular nestes tipos celulares.

Culturas de cardiomiócitos, FC e mioblastos L6E9 foram cultivadas e tratadas com TGF- β por 1h sob as mesmas concentrações testadas para expressão de FN nesses tipos celulares.

Análises de *western blot* em culturas de FC revelaram que a partir de 1ng/ml de TGF- β , ocorre um aumento no nível de fosforilação de SMAD2, em contraste com cardiomiócitos (Figura 4.6A). Esse aumento de PS2 é melhor observado após tratamento com doses maiores TGF- β , enquanto cardiomiócitos apresentam disparo da via somente após doses maiores (5-15 ng/ml). Os níveis de fosforilação de SMAD 2 em FC são significativamente maiores que cardiomiócitos (Figura 4.6A).

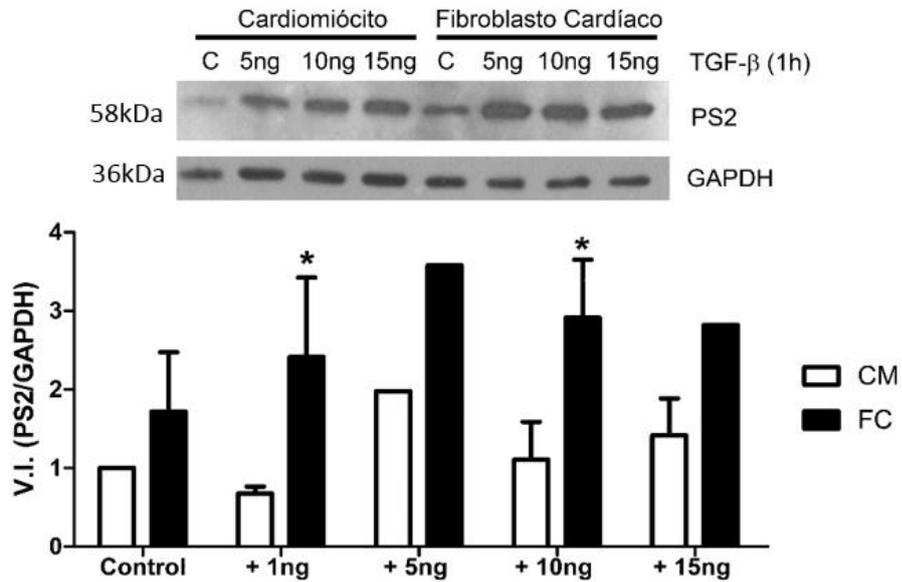
Mioblastos esqueléticos L6E9 tratados com TGF- β (1-10ng/ml) apresentaram comportamentos similares nos níveis de expressão de PS2 quando comparados com culturas de FC. A partir de 1ng/ml foi observado um aumento na fosforilação de SMAD2 sendo melhor observado quando tratados com 10ng/ml. Quando comparados com MC, os níveis de fosforilação de SMAD 2 em L6E9 foram maiores e estatisticamente significativos. Além disso, o inibidor da via clássica de sinalização do TGF- β , o SB431542 impediu a fosforilação de SMAD 2 em mioblastos L6E9 resultando em níveis similares a cultura controle (Figura 4.6B).

Figura 4.6 – Detecção de SMAD 2 fosforilada (PS2) em culturas normais.

(A) Comparação da detecção de PS2 em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos e (B) CM e mioblastos esqueléticos L6E9 tratados com TGF- β (1-15ng/ml) por 1h. Níveis basais de PS2 em FC (A) e L6E9 (B) são significativamente maiores que CM. Após a adição de TGF- β , a fosforilação de SMAD 2 continua sendo significativamente maior em FC (A) e L6E9 (B) em relação à CM. Apesar do disparo da via ter sido visualizado desde 1 ng/mL em cardiomiócitos, mesmo com concentrações elevadas desta citocina, o nível de fosforilação de SMAD 2 não alcançou os níveis de FC e L6E9. Em FC (A) e L6E9 (B) os níveis de PS2 aumentam de forma dose dependente. O inibidor SB431542 reduziu a fosforilação de SMAD 2 em CM e L6E9 (A). * $p \leq 0,05$ quando comparados com MC, N=3.

A

Deteccão de Smad 2 fosforilada (PS2) em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos



B

Deteccão de Smad 2 fosforilada em cardiomiócitos e mioblastos esqueléticos L6E9

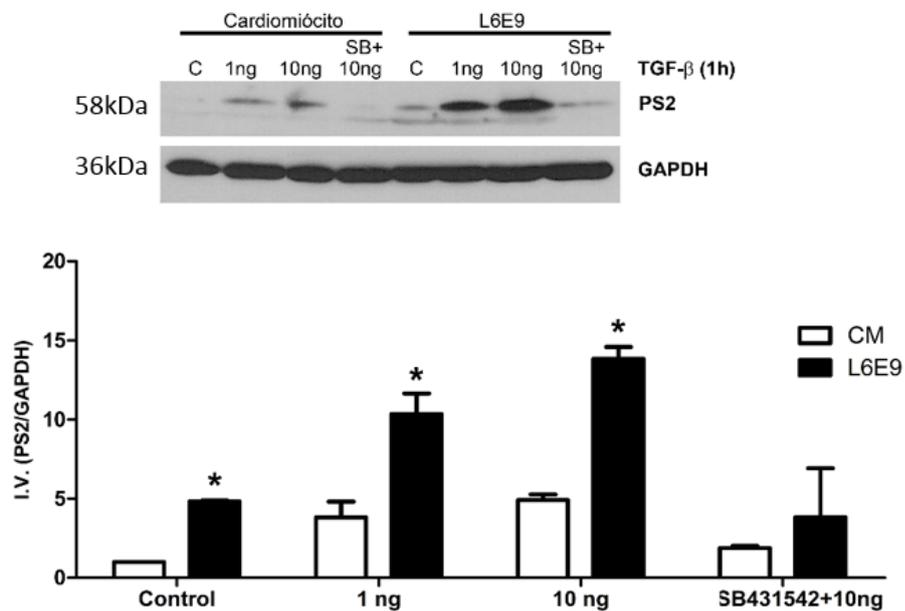


Figura 4.6

4.7 – Detecção de p38 MAPK fosforilada em culturas de fibroblastos cardíacos e mioblastos esqueléticos comparados com cardiomiócitos tratados com TGF- β .

Em paralelo ao resultado obtido nos níveis de fosforilação de SMAD 2 em FC obtidos na 5ª passagem e mioblastos L6E9 comparados com CM, também avaliamos a fosforilação de p38 MAPK nesses tipos celulares após o tratamento com TGF- β (1-10ng/ml) por 1h.

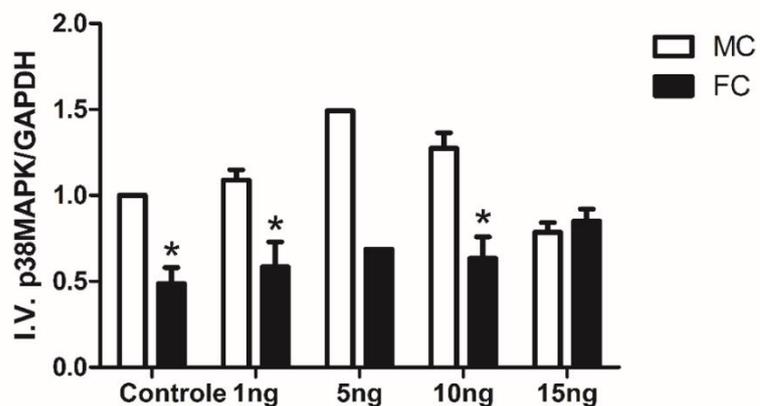
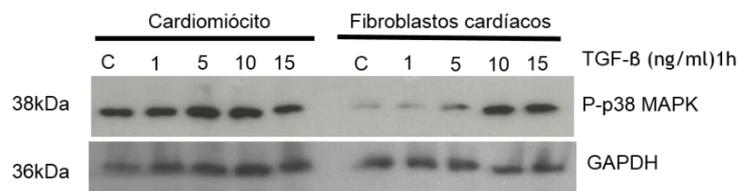
Culturas de FC apresentam níveis de fosfo-p38 MAPK reduzidos quando comparados com CM. Mesmo com o tratamento por 1h de 1ng/ml e 10ng/ml de TGF- β , os níveis de fosforilação de p38 MAPK de FC foram significativamente menores que CM, que apresentaram aumento dose dependente desta proteína de sinalização (Fig. 4.7A).

Em contraste, culturas de mioblastos esqueléticos L6E9 apresentam aumento significativo nos níveis de fosforilação de p38 MAPK quando comparados com MC (Fig. 4.7B). A adição de 1ng/ml de TGF- β em mioblastos L6E9 disparou aumento nos níveis de fosforilação de p38 MAPK nesse tipo celular, que se manteve após tratamento com doses mais elevadas de TGF- β . No entanto, em todas as concentrações analisadas, CM tratados não alcançaram o nível de fosforilação de p38 MAPK de L6E9, sendo esses resultados estatisticamente significativos.

Figura 4.7 – Detecção de p38 MAPK fosforilada em culturas não infectadas. (A) Comparação da detecção de fosfo-p38 MAPK entre cardiomiócitos (CM) e fibroblastos cardíacos (FC). Resultados revelam que CM apresentam níveis de fosfo-p38 MAPK mais altos do que FC após o estímulo com TGF- β . (B) Comparação da detecção de fosfo-p38 MAPK entre CM e mioblasto esquelético L6E9 tratados com TGF- β (1-15ng/ml). Quando comparados com mioblastos L6E9, CM desempenha baixa fosforilação de p38MAPK. * $p \leq 0.05$ quando comparados com MC, N=3.

A

Detecção de p38 MAPK fosforilada em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos

**B**

Detecção de p38MAPK fosforilada em cardiomiócitos e mioblastos esqueléticos L6E9

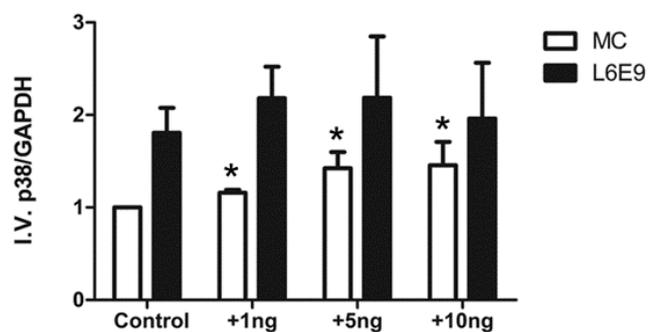
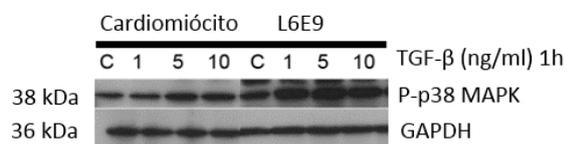


Figura 4.7

4.8 – Detecção de SMAD2, p38 MAPK e c-Jun fosforiladas em culturas de fibroblastos cardíacos infectadas com *T. cruzi* e tratadas com TGF- β .

Em culturas de FC obtidos na 5ª passagem normais e infectadas com *T. cruzi* e tratadas com TGF- β , foram avaliados os níveis de fosforilação de proteínas da via clássica e alternativa do TGF- β , visando investigar sua participação na modulação de componentes de matriz extracelular.

FC com 72h de infecção pelo *T. cruzi* apresentam uma redução nos níveis de fosforilação de SMAD 2 quando comparados com seus pares normais. Mesmo após 1h de tratamento com 10ng/ml de TGF- β , culturas infectadas continuaram apresentando uma redução nos níveis de fosforilação de SMAD 2 quando comparados com o normal tratado. Por sua vez, FC infectados com *T. cruzi* e tratados com TGF- β , mostraram aumento na fosforilação de SMAD2 quando comparados com a cultura infectada não tratada. Como esperado, o inibidor da via clássica de TGF- β (SB431542), reduziu o nível de fosforilação de SMAD 2 (Fig. 4.8A). Os resultados em relação a fosforilação de SMAD 2 não foram modulados pela infecção, uma vez que culturas com alto e baixo grau de infecção apresentaram resultados semelhantes, sendo o gráfico correspondente a média de experimentos independentes (N=3).

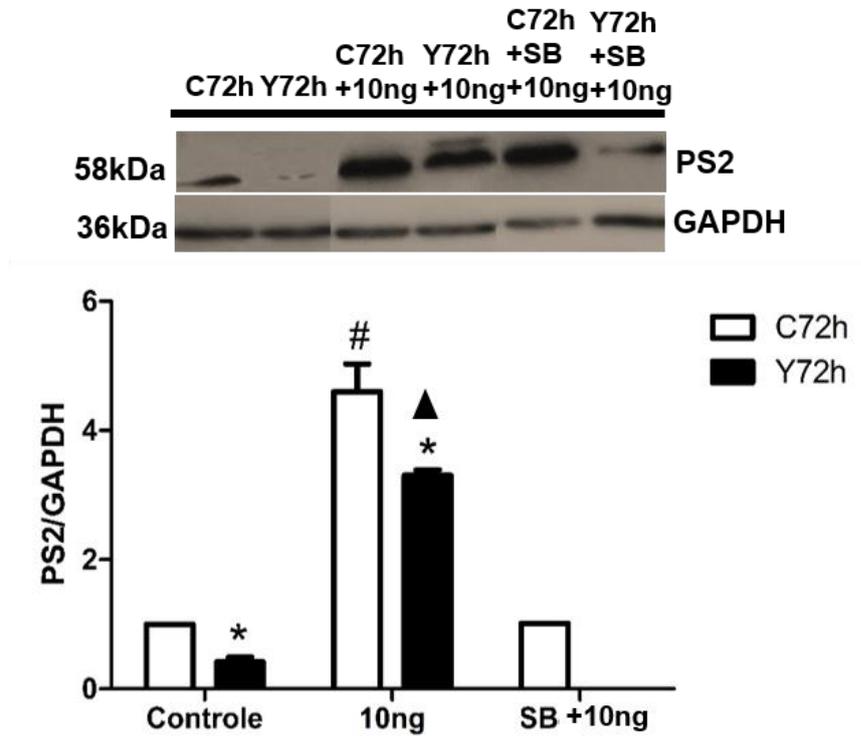
Fibroblastos cardíacos infectados apresentam níveis de fosforilação de p38 MAPK semelhantes ao controle normal, com tendência a aumento em algumas culturas. Com a adição de 10ng/ml houve um disparo na via de p38 MAPK em culturas normais e infectadas pelo *T. cruzi*. Interessantemente, utilizando o inibidor da via de PS2 (SB431542), houve uma redução nos níveis de fosforilação de p38 MAPK em culturas normais e infectadas com a presença do inibidor. Isso demonstra que as via clássica e alternativa podem interagir neste tipo celular (Fig. 4.8B). Todas as amostras analisadas para fosfo-p38 MAPK correspondem a culturas de FC com alto grau de infecção.

Além de avaliar a modulação das vias de SMAD e de p38 MAPK, também analisamos a via c-Jun em FC normais e infectados com *T. cruzi* (Fig. 4.8C). A infecção pelo *T. cruzi* resultou em aumento na fosforilação de c-Jun em culturas de FC quando comparadas com células normais. Em culturas de FC normais e tratadas com 10ng/ml de TGF- β foi observado um aumento de 25% na fosforilação de c-Jun. No entanto, quando as culturas de FC infectadas foram tratadas com 10ng/ml de

TGF- β , o aumento na fosforilação de c-Jun foi potencializado, alcançando um acréscimo de 34% quando comparados com cultura infectada não tratada. A ação do SB431542, inibidor do receptor do TGF- β também impediu a fosforilação de c-Jun em FC normais e infectados. Os dados representam culturas com alto e baixo grau de infecção, que foram representadas em conjunto uma vez que os resultados foram semelhantes.

Figura 4.8 – Detecção de SMAD 2, p38 MAPK e c-Jun fosforilados em fibroblastos cardíacos normais e infectados com *T. cruzi*. (A) Detecção de PS2, mostrando aumento na fosforilação de SMAD 2 em FC normais tratados com 10ng/ml de TGF- β . FC infectados não foram capazes de disparar a via clássica de sinalização mesmo quando tratados com 10ng/ml, quando comparados com seu par não infectado. O inibidor SB431542 impediu a fosforilação de SMAD 2 em culturas de FC após estímulo com TGF- β . (B) Detecção de fosfo-p38 MAPK. Em culturas de FC normais tratados com 10ng/ml de TGF- β ocorre um aumento nos níveis de fosforilação de p38 MAPK. A infecção pelo *T. cruzi* não resulta em diferença significativa na fosforilação de p38 MAPK, apesar de ocorrer tendência a aumento. Após adição de 10ng/ml de TGF- β , esta via é significativamente disparada em FC. O inibidor do receptor do TGF- β SB431542 impediu a fosforilação de p38 MAPK em FC normais e infectados tratados com 10ng/ml de TGF- β . (C) Detecção de c-Jun fosforilada. Note que a infecção pelo *T. cruzi* leva a um disparo da via de c-Jun. A adição de TGF- β em culturas normais resulta em 25% de aumento da detecção de c-Jun. O aumento disparado pela infecção se mantém e é potencializado pelo tratamento com TGF- β . * $p \leq 0,05$ quando comparado com controle não infectado e não tratado; # $p \leq 0,05$ quando comparado com pares tratados e não infectados; ▲ $p \leq 0,05$ quando comparado com controle infectado sem tratamento, N=3.

A Detecção de Smad 2 fosforilada (PS2) em Fibroblastos Cardíacos



B Detecção de p38 MAPK fosforilada em Fibroblastos cardíacos

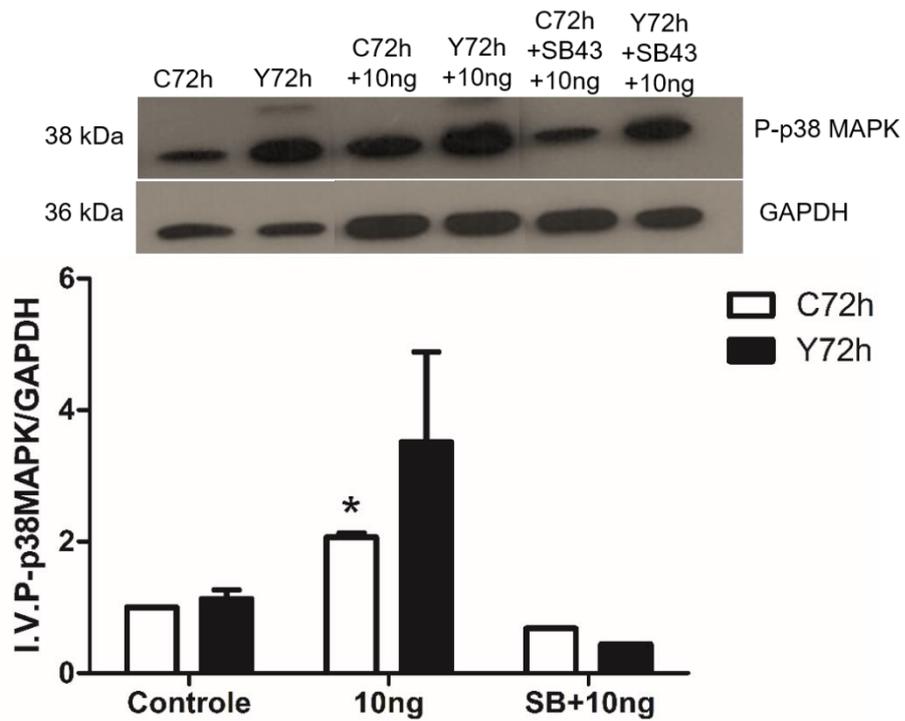


Figura 4.8

C Detecção de c-Jun fosforilada (p-c-Jun) em Fibroblastos Cardíacos

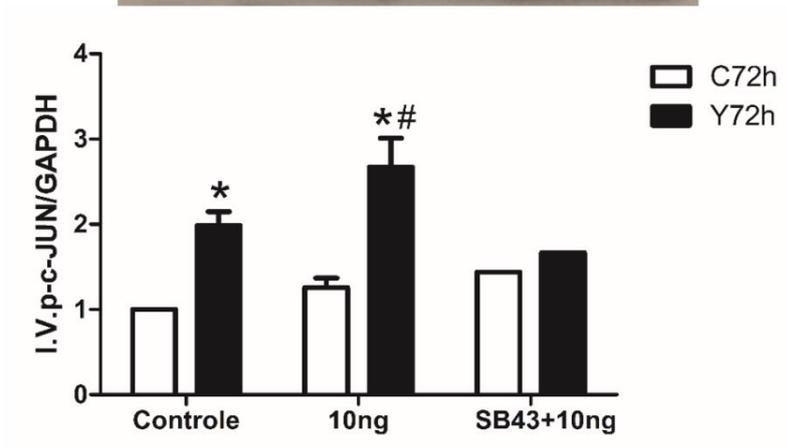
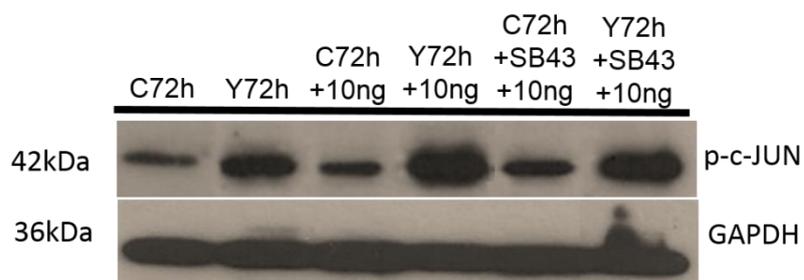


Figura 4.8

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO.

Um dos achados observados da patologia da cardiomiopatia chagásica crônica é a fibrose cardíaca, que é caracterizada pelo aumento e deposição de componentes de matriz extracelular no miocárdio. O TGF- β por ser uma citocina pró-fibrogênica, desempenha um papel importante na atividade biológica do FC e atua na regulação de componentes de matriz extracelular em muitos tecidos. Essa citocina é importante porque está intimamente implicada na gênese da fibrose cardíaca na doença de Chagas (76).

O modelo experimental utilizado nesse estudo foi cultura de FC bidimensional. Esse método foi escolhido porque já temos disponíveis dados significativos do nosso grupo utilizando modelo semelhante de cardiomiócitos. Além disso, muitas questões com relação a interação parasito-célula hospedeira foram respondidas com culturas de fibroblastos infectadas, que também forneceram informações sobre a fisiologia do parasito. Porém, modelos em 3D de cultura de cardiomiócitos e fibroblastos infectados pelo *T. cruzi* já foram desenvolvidos (98). Os dados demonstram que o volume do microtecido infectado com *T. cruzi* aumenta cerca de 4 a 6 vezes com elevada expressão de laminina, fibronectina e colágeno IV após 144h de infecção. No entanto, apesar dos resultados sugerirem que esferóides infectados possam ser um bom modelo experimental para estudo da fibrose na doença de Chagas, os microtecidos possuem excessivo número de fibroblastos cardíacos em relação a cardiomiócitos. Além disso, os esferóides não permitem um estudo específico da resposta característica de cada tipo celular separadamente, o que foi alvo do nosso estudo com cultura bidimensional, que mostrou que cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos apresentam respostas bastante distintas frente a infecção e ao tratamento com TGF- β .

Dados da literatura mostram como ocorre a modulação na expressão de FN em cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* e tratados com TGF- β (90), no entanto não há relatos sobre a expressão de FN e a via de sinalização clássica e alternativa do TGF- β em FC e mioblastos L6E9, que foram células utilizadas nesses estudos. Nesse estudo, foi analisado a distribuição e expressão de FN em FC e mioblastos esqueléticos da linhagem L6E9 normais e infectados com *T. cruzi* e tratados com TGF- β (1-10ng/mL) e o papel da via de sinalização clássica e alternativa na modulação de fibronectina na matriz extracelular.

Nossos dados revelaram que FC e mioblastos L6E9 apresentam aumento de FN a partir de doses baixas de TGF- β (1ng/ml), e esse aumento foi melhor observado quando tratados com doses elevadas da citocina (5ng/ml e 10ng/ml). Culturas de cardiomiócitos normais responderam ao estímulo apenas quando tratados com 10ng/ml (90). Estes dados corroboram evidências de aumento de MEC no coração relacionados à presença de TGF- β em diversos modelos (76,99) e ainda, confirmam a baixa resposta de cardiomiócitos ao estímulo a esta citocina, previamente reportado por nosso grupo (97). Os resultados obtidos com mioblastos L6E9 e fibroblastos também estão de acordo com dados da literatura, sendo observado aumento de colágeno e FN em L6E9 a partir de 50 pM de TGF- β (92,100) e em fibroblastos cardíacos após tratamento com 5 ng/ml de TGF- β (101). Este conjunto de dados associados à prevalência de fibroblastos no tecido cardíaco, que são células importantes na síntese e remodelamento de MEC (53), sugerem que fibroblastos cardíacos desempenham papel fundamental no remodelamento da matriz extracelular do miocárdio através da resposta funcional a estímulos com TGF- β .

As diferenças observadas em relação à expressão de matriz extracelular podem potencialmente ser explicadas pela expressão distinta de receptores de TGF- β nestes tipos celulares. Dados da literatura demonstraram que a endogлина, um dos receptores de TGF- β do tipo III, é capaz de influenciar algumas respostas celulares frente ao estímulo do TGF- β , atuando como um fator de regulação na expressão de MEC na presença do TGF- β (102). No entanto, células musculares esqueléticas não apresentam na superfície a endogлина, que é uma proteína integral de membrana que atua como um receptor auxiliar do TGF- β 1, TGF- β 3, activin-A, BMP-2 e BMP-7. Esse receptor participa na regulação de componentes de matriz extracelular na presença do TGF- β . Estudos realizados em mioblastos L6E9 mostram que esse tipo celular não apresenta endogлина nem em condições basais e nem com o estímulo do TGF- β . A presença do TGF- β neste tipo celular levou a um aumento na síntese de colágeno e de PAI-1. Com a transfecção de endogлина em mioblastos L6E9 e o estímulo com o TGF- β , houve uma diminuição na expressão de colágeno na matriz extracelular (103). Em fibroblastos cardíacos, a endogлина é expressa constitutivamente e é estimulada pela angiotensina, que é capaz interagir com TGF- β e estimular a matriz extracelular, sendo molécula crítica para a sinalização de TGF- β (104,105).

A análise de imunofluorescência indireta revelou que culturas de FC e mioblastos L6E9 infectadas e tratadas com TGF- β (1-10ng/ml), apresentaram respostas similares quanto à expressão de FN na superfície celular. A infecção nesses tipos celulares levou a uma modificação na distribuição de fibrilas de FN nas células infectadas. Foi observado que em células altamente infectadas, independente do tratamento com TGF- β ocorre uma redução na distribuição de FN na matriz extracelular. Portanto, o aumento observado de FN nas culturas infectadas e tratadas com TGF- β parecem estar localizados em células não infectadas adjacentes que responderam ao estímulo do TGF- β .

Foi visualizada a distribuição espacial de FN por imunofluorescência indireta em culturas de mioblastos esqueléticos L6E9 normais e infectadas tratadas com TGF- β (1-10ng/ml). Em culturas normais de mioblastos L6E9 tratados com TGF- β foi observado que a partir de 1ng/ml ocorre um aumento na distribuição de FN na superfície celular quando comparados com culturas controle. No entanto, o aumento na distribuição de fibrilas de FN na superfície é melhor observado quando tratados com 5ng/ml e 10ng/ml de TGF- β sendo esses resultados similares à culturas de FC normais tratadas com TGF- β . Já em mioblastos L6E9 infectados com *T. cruzi*, células que apresentavam ninhos de amastigotas mostraram uma redução na distribuição de FN na superfície da célula infectada. Após o tratamento com TGF- β em culturas de mioblastos L6E9 observa-se que células não infectadas responderam à citocina, o que levou a um aumento na espessura de fibrilas de FN na superfície celular. Dados obtidos de *western blot* corroboram os dados da imunofluorescência quanto a expressão de FN na matriz extracelular em culturas de mioblastos L6E9, sendo expressivo o aumento de FN em culturas de mioblastos L6E9 normais tratados com TGF- β , de uma maneira dose dependente. Já em culturas infectadas e tratadas com TGF- β , houve uma redução na expressão de FN quando comparados com seus pares normais tratados.

Essa redução de FN observada especificamente na matriz extracelular da célula infectada pode estar associada a vários fatores, como a quebra do citoesqueleto de actina provocados pela infecção, que impede o ancoramento de FN a integrinas na superfície celular (106). Além disso, uma redução significativa nos níveis de RNAm no citoplasma da célula hospedeira, concomitante com a proliferação de amastigotas também foi observado, sugerindo que a multiplicação

intracelular do *T. cruzi* possa afetar a estabilidade de RNAm do hospedeiro, o que resultaria em níveis reduzidos de síntese protéica (107,108). A infecção pelo *T. cruzi* também poderia diminuir a síntese e expressão de receptores de TGF- β na superfície da célula, assim como pode levar à ativação de SMADs inibitórias (SMAD 6 e 7), impedindo que ocorra a via de sinalização de SMADs emitidos pelo TGF- β e que o seu sinal não seja translocado para o núcleo (99).

Culturas de FC infectadas apresentaram variações quanto ao grau de infecção. A expressão de BiP_{Tb} revelou quantitativamente o nível de infecção nos extratos de FC. Com isso, devido a essa variação quanto ao grau de infecção, a expressão de FN foi distinta. Culturas de FC controle com alto grau de infecção, apresentaram um aumento expressivo de FN. No tecido cardíaco infectado com *T. cruzi*, diferentes citocinas e quimiocinas como TNF- α , IL-1 β e iNOS são secretadas em resposta a infecção instalada. Essas moléculas são importantes porque auxiliam na síntese de NO que possui uma atividade microbicida contra o *T. cruzi* (109). Essas citocinas são secretadas em resposta à infecção por células inflamatórias, ausentes em nosso modelo experimental, mas cardiomiócitos e FC também são células capazes de liberar esses mediadores inflamatórios que modulam o recrutamento de leucócitos para o local da injúria para conter a infecção e atuam no remodelamento tecidual do tecido lesionado (109). A alta expressão de FN nessas culturas altamente infectadas sugere que o estresse celular frente a alta infecção faz com que essas células liberem citocinas como o TNF- α e que, células não infectadas pertencentes a cultura infectada, recebam o estímulo juntamente com o TGF- β , potencializando e modulando a síntese e liberação de FN na matriz extracelular uma vez que já que foi observado que na fibrose cardíaca, o TNF- α pode estar envolvido no dano cardíaco ou no reparo, desenvolvendo a fibrose com o acúmulo excessivo de matriz extracelular (110), e culturas mistas de cardiomiócitos e FC apresentam aumento de FN frente ao estímulo com esta citocina (97).

Fibroblastos cardíacos, independente do grau de infecção, apresentaram redução na expressão de FN mesmo após tratamento com doses elevadas de TGF- β . Essa redução de FN nas culturas de FC infectadas e tratadas sugere que o parasito possa estar impedindo diretamente a síntese e secreção de proteínas de matriz mesmo com o estímulo exógeno, de TGF- β . Fatores de crescimento como o TGF- β e o CTGF/CCN2, promovem a diferenciação para miofibroblastos e assim estimulam a síntese de matriz extracelular. Quando a expressão de CTGF/CCN2

encontra-se desregulada no tecido, resulta em uma cicatrização em excesso e fibrose devido a uma sobrecarga do fator de crescimento no local (111). No entanto, dados da literatura revelam que fibroblastos de derme infectados com *T. cruzi* apresentam uma inibição na expressão de CTGF/CCN2 devido a liberação de fatores do parasito que influenciam a expressão desse fator de crescimento. Mesmo com a presença do TGF- β em fibroblastos de derme infectados, a via de sinalização para o CTGF/CCN2 encontrou-se comprometida, podendo estar impossibilitando a resposta ao TGF- β e inibindo a transcrição e tradução de FN na superfície celular (112). Portanto, em culturas de FC infectadas e tratadas com TGF- β , a expressão de FN pode estar sendo prejudicada por esses fatores liberados pelo parasito que estariam impedindo a ação do TGF- β na célula alvo, perturbando a via de sinalização clássica e alternativa para a expressão de FN neste tipo celular mais especificamente na célula infectada. Nas culturas com baixo grau de infecção, esse fato impactaria a expressão global de FN medida por *western blot*. Nas culturas com alto grau de infecção, este fato aconteceria localizadamente na célula infectada, enquanto as células não infectadas adjacentes responderiam ao estímulo de TGF- β e outras citocinas produzidas em resposta à infecção.

Nosso estudo também avaliou vias de sinalização clássica e alternativa do TGF- β (1-10ng/ml) em culturas de MC, FC e mioblastos L6E9. Em culturas de FC e mioblastos L6E9, a fosforilação de SMAD2 foi maior quando comparada com CM. Níveis de PS2 mais elevados foram observados com doses maiores de TGF- β . No entanto a expressão de p38 MAPK foi maior em culturas de CM e mioblastos L6E9 e menor em FC com 1h de tratamento de TGF- β .

O TGF- β é uma citocina que regula várias respostas biológicas como proliferação e diferenciação celular, apoptose, migração celular, resposta imune e produção de matriz extracelular. Em FC e mioblastos L6E9 foi detectado que o nível de fosforilação de SMAD 2 foi maior quando comparado com CM. Estudos apontam que o aumento no nível de fosforilação de SMAD3 favorece o desenvolvimento da fibrose, já que camundongos nocaute para SMAD 3 foram resistentes ao desenvolvimento da fibrose na pele e no pulmão (113). Dados revelam que a deposição reduzida de MEC por fibroblastos nocaute para SMAD 3 in vivo pode ser revertida após a adição exógena de TGF- β , através de vias independentes de SMAD que serão acionadas pelo TGF- β podendo levar a deposição de componentes de matriz extracelular (114,115). Além disso, experimentos realizados utilizando um

dominante-negativo de SMAD3 ou de SMAD4 revelaram que vias de SMAD's são dispensáveis para ativação de vias alternativas induzidas pelo TGF- β como p38 MAPK e JNK, sugerindo que a via MAPK é ativada independente de vias de SMAD's dependendo do tipo celular e do tempo (72).

A via de sinalização de p38 MAPK é importante porque participa na regulação do sistema imune e no processo inflamatório, participando também no controle fisiológico da célula e modulando o ciclo celular e o remodelamento do citoesqueleto (116). No tecido cardíaco, a via de sinalização de p38 MAPK é encontrada numa forma dominante. Conseqüentemente a ativação dessa via, acarreta a hipertrofia de cardiomiócitos, o que ocorre devido a sinalização da via através da ação de seus ativadores MKK3 e MKK6 presentes em cardiomiócitos (116). Nossos dados mostram que a detecção de p38 MAPK mais alta em cardiomiócitos que FC, sugerindo que a via de p38 MAPK possa estar resultando em hipertrofia e não em fibrose em cardiomiócitos. Quando o TGF- β liga no seu receptor específico, a via clássica e a alternativa podem interagir entre si potencializando o sinal. Dados demonstram que em células de glioblastomas, células tumorais dreferatárias à inibição de TGF- β , as vias de SMAD e de p38 MAPK são ativadas pelo receptor. O TGF- β ativa nesse tipo celular a via clássica e a alternativa. Porém com a inibição da via de p38 MAPK por SB202190, os níveis de fosforilação de SMAD2 encontram-se reduzidos, mostrando a intensa interação que uma via tem sob a outra no momento da sinalização (117).

Em nosso trabalho, avaliamos as vias de sinalização clássica e alternativa do TGF- β em FC, MC e em mioblastos esqueléticos normais, assim como também investigamos o perfil dessas vias após infecção pelo *T. cruzi* em FC. Independente dos níveis de infecção encontrados em FC, os níveis de PS2 encontraram-se reduzidos mesmo após a adição de TGF- β (1h), nesse tipo celular. No entanto, a presença do parasito intracelular em FC pode estar modulando a via clássica de sinalização e impedindo com que haja a transdução do sinal no núcleo. Por sua vez, em cardiomiócitos, foi visualizado que amastigotas capturam o TGF- β endógeno e exógeno para sua multiplicação e desenvolvimento na célula hospedeira, participando assim do ciclo de vida do parasito (118). Em culturas mistas de cardiomiócitos e FC foi observado que SB431542, inibidor de ALK5, reduziu a invasão e desenvolvimento intracelular de *T. cruzi* mesmo com a presença de doses

elevadas de TGF- β , indicando que o inibidor reduz não somente a invasão e a liberação de formas tripomastigotas em cultura mista de cardiomiócitos e FC (80).

Vias alternativas do TGF- β também foram estudadas em FC infectados e tratados com TGF- β . Com o tratamento com a citocina, foi observado um aumento na fosforilação de p38MAPK. A fosforilação de p38 MAPK pode modular a resposta biológica da célula levando à deposição de matriz extracelular. Dados demonstram que em cultura de macrófagos altamente infectadas com *T. cruzi*, a adição exógena de cruzipaina, a cisteína protease mais abundante de *T. cruzi*, e do inibidor da via JNK, SP600125, induz disparo e amplificação do sinal de p38 MAPK nesse tipo celular, favorecendo a sobrevivência e amplificação do parasito em macrófagos (119).

Além do TGF- β e do CTGF que são fatores pró-fibróticos, a angiotensina II é uma molécula muito importante no desenvolvimento da fibrose. A ligação da Ang-II no seu receptor específico AT-1, induz em células do músculo esquelético, a expressão de TGF- β e CTGF (120). Em culturas de fibroblastos cardíacos, estudos apontam que a via que medeia a indução de TGF- β por Ang-II nesse tipo celular é a via ERK-1/2 MAPK, enquanto a expressão de CTGF é mediada pela ativação da via de p38 MAPK (121). Como a via de sinalização p38 MAPK é dominante no tecido cardíaco e que em nossos estudos cardiomiócitos apresentam maior fosforilação de p38 MAPK em células não infectadas do que outros tipos celulares, essa via também pode estar sendo acionada frente a infecção e conduzindo à liberação de mediadores inflamatórios em cardiomiócitos, já que estudos revelam que essa célula infectada com *T. cruzi* libera diversos mediadores inflamatórios (35).

Outras vias de sinalização, como a Wnt canônica, também são ativadas pelo TGF- β em doenças fibróticas e potencialmente estimulam células como fibroblastos à deposição de tecido fibroso. A inibição da via Wnt canônica reduz os efeitos pró-fibróticos estimulados pelo TGF- β (122). Vias de sinalização disparada por FAK também têm um importante efeito pró-fibrótico. FAK não é somente um mediador central que promove a ligação célula-MEC, mas também participa na diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos que são células que secretam matriz extracelular abundantemente, e inibidores da via de FAK suprimem respostas fibrogênicas bloqueando a sinalização do TGF- β (123). Assim, vias Wnt canônica e FAK podem também ser alvos potenciais para novas abordagens anti-fibróticas.

Nossos resultados também revelaram que a infecção pelo *T. cruzi* aumenta a fosforilação de c-Jun em FC. Em culturas de macrófagos infectadas pelo *T. cruzi*, também foi observado um aumento na fosforilação de c-Jun, enquanto a via de p38 MAPK foi disparada somente pela cruzipaina e não pelo parasito. Porém, quando macrófagos foram pré-tratados com cruzipaina e depois foram infectados com o *T. cruzi*, houve uma inibição na fosforilação de c-Jun nesse tipo celular (119). Esses dados demonstram que o parasito possui uma importante participação na ativação de c-Jun tanto em macrófagos quanto em culturas de fibroblastos cardíacos, onde foi observado um aumento na fosforilação de c-Jun disparada pela infecção, independente do tratamento com o TGF- β .

Quando o TGF- β se liga no seu receptor, ocorre uma ativação rápida de c-Jun dependendo do tipo celular, dependente de Rho e independente de SMAD's (72). Uma vez ativada, a c-Jun fosforila SMAD 3 facilitando sua ativação pelo receptor do tipo I, potencializando o sinal e o acúmulo no núcleo de SMAD3 fosforilada. Portanto, a via c-Jun pode reforçar a via clássica de sinalização através da fosforilação de SMAD3 (74). Quando ocorre uma situação de estresse no tecido cardíaco, como uma isquemia/reperfusão com a inibição metabólica principalmente em cardiomiócitos, a via c-Jun é ativada e leva a morte celular em cardiomiócitos. A proteína Bcl-2 possui um efeito cardioprotetivo, no entanto, quando a via c-Jun fosforila Bcl-2, este acaba perdendo a função anti-apoptótica. Já em fibroblastos NIH3T3, quando ocorre a inativação da via c-Jun, aumenta a apoptose em fibroblastos pela indução de TNF- α (124). Além do TGF- β , outro fator que também ativa via de c-Jun é a angiotensina II. Em cardiomiócitos, a interação da Ang-II no seu receptor AT-1, ativa a via c-Jun e promove a hipertrofia de cardiomiócitos com a presença desse ligante (125). A ativação da via de JNK em cardiomiócitos é realizada através de um *upstream* o MKK7 que induz a hipertrofia celular caracterizando um aumento no tamanho da célula e uma organização aumentada da estrutura sarcomérica. Dados revelam o envolvimento da via de p38 MAPK na hipertrofia de cardiomiócitos, no entanto, a co-ativação de JNK e p38 MAPK em cardiomiócitos falham em sinergizar os efeitos hipertróficos (126).

Estudos apontam que em células linhagem celular BAHgpt, derivadas de fibrosarcoma humano, o estímulo de FN induzido por TGF- β , é dependente da ativação da via de c-Jun, e o gene que codifica FN nesse tipo celular é alvo direto

da via c-Jun (127). No entanto, a ativação unicamente de JNK mediada pelo TGF- β , não é suficiente para síntese de FN em outros tipos celulares (128).

Uma lesão tecidual sinaliza fibroblastos a migrar para o local e conter a injúria com a deposição de componentes de matriz extracelular, com ação de mediadores pro-inflamatórios como o TGF- β , que promovem a diferenciação para miofibroblastos. Uma das características do miofibroblastos é a presença de α -SMA que acaba conferindo uma contratilidade a célula. A via de JNK é responsável por promover essa diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos na presença do TGF- β . No entanto, em fibroblastos, a proteína FAK possui um papel importante no processo de remodelamento de matriz extracelular em fibroblastos. Uma vez TGF- β ligado no seu receptor em fibroblastos, FAK é ativada e sua sinalização promove a ativação de uma cinase MEKK1 que possui uma função de ativar a via JNK em fibroblastos. Essa interação FAK/JNK é importante para organização da fibra de estresse de α -SMA, para contração da matriz e a indução da expressão de genes pró-fibróticos em fibroblastos (129). Portanto, o TGF- β possui a habilidade de proporcionar o remodelamento da matriz em fibroblastos através da interação FAK/JNK. Isso demonstra que ocorre cruzamento entre a cascata de sinalização adesiva e a sinalização alternativa do TGF- β em fibroblastos. Assim, vias de FAK e JNK são candidatas ao desenvolvimento seletivo de terapias anti-fibróticas.

Em conjunto, nossos estudos abrem novas perspectivas para aprofundar o entendimento dos mecanismos de regulação da matriz de FN por TGF- β em cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e miofibroblastos L6E9, apontando novas direções de alvos terapêuticos contra a fibrose cardíaca na doença de Chagas.

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

- I. A expressão de FN é modulada diferencialmente por TGF- β em tipos celulares distintos, com mioblastos L6E9 e FC sendo mais susceptíveis que CM ao estímulo de FN por esta citocina, num mecanismo modulado pela ativação de SMADs, enquanto a via de p38 MAPk é mais ativada em células musculares.

- II. A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* leva à uma redução de FN localizada especificamente na célula infectada em todos os tipos celulares avaliados, independente do estímulo com TGF- β , possivelmente relacionado à menor ativação de SMADs. O estímulo de FN por TGF- β é observado em células não infectadas adjacentes da cultura infectada.

- III. A expressão de FN em FC infectados pelo *T. cruzi* é modulada pelo grau de infecção da cultura.

- IV. Vias de sinalização da via alternativa (p38 MAPK e c-Jun) do TGF- β são ativadas em FC mesmo após a infecção pelo *T. cruzi*, sugerindo sua investigação como alvos terapêuticos contra fibrose.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os dados obtidos no nosso estudo revelam que a expressão de FN na matriz extracelular de fibroblastos cardíacos depende do grau de infecção pelo *T. cruzi*, e que as vias alternativas disparadas pelo TGF- β podem participar do processo de modulação da fibrose. Assim, propomos que culturas de fibroblastos cardíacos infectados com *T. cruzi*, que apresentavam baixo grau de infecção, apresentam redução na expressão de fibronectina na matriz extracelular uma vez que a célula infectada em si tem a matriz reduzida e as células adjacentes não apresentam modulação de componentes de MEC (Fig. 7.1). Já culturas de FC com alto grau de infecção pelo *T. cruzi* apresentaram aumento na expressão de FN independente do tratamento com o TGF- β . Os FC altamente infectados podem potencialmente estar ativados e secretar mediadores inflamatórios e citocinas, como TNF- α , IFN- γ e TGF- β , resultando em efeito parácrino nos FC não infectados da cultura, com fosforilação de proteínas da via MAPk como p38MAPK e c-Jun resultando em estímulo da síntese e secreção de FN na matriz extracelular. Curiosamente, a via de Smad 2 encontra-se reduzida em culturas de FC infectados pelo *T. cruzi* (Fig. 7.1). Ensaio confirmando as vias de sinalização e as citocinas secretadas em sobrenadantes de culturas infectadas estão previstos.

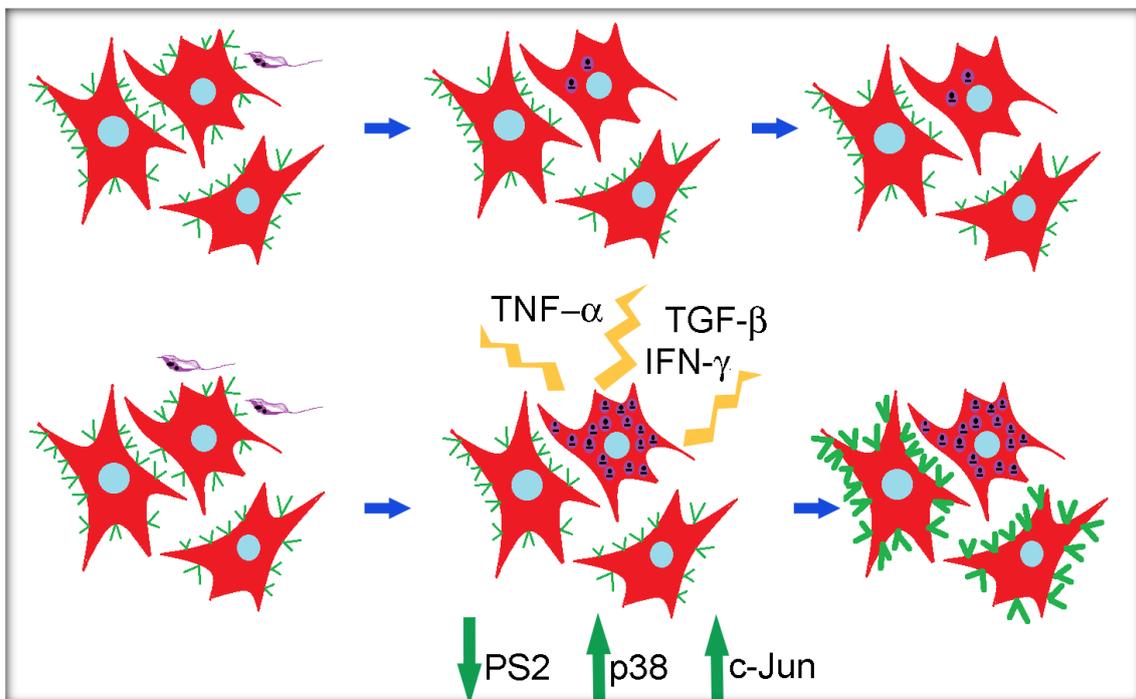


Figura 7.1. Modelo esquemático representando a modulação da expressão de FN em culturas de fibroblastos cardíacos infectados com *T. cruzi*.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

8- Referências Bibliográficas.

1. Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1, no:2:0074–276.
2. Bonney KM. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? Parasite. 2014 Jan;21:11.
3. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. Elsevier Ltd; 2010 Apr 17;375(9723):1388–402.
4. Coura JR. The main scenarios of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;00(ahead):00–00.
5. Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012 Jun;26(2):275–91.
6. Ortí-Lucas RM, Parada-Barba MC, de la Rubia-Ortí JE, Carrillo-Ruiz A, Beso-Delgado M, Boone ALD. Impact of chagas disease in bolivian immigrants living in europe and the risk of stigmatization. J Parasitol Res. 2014 Jan;2014:514794.
7. Noya BA De, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2015 Apr 28 [cited 2015 May 12];110(May):377–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946155>
8. Pereira PCM, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2013 Jan;19(1):34.
9. Steverding D. The history of Chagas disease. Parasit Vectors. 2014 Jan;7(1):317.
10. WHO. Chagas Disease- factsheet. Wkly Epidemiol Rec. 2012;(51):519–22.

11. Coura JR, Borges-pereira J. What is known and what should be improved : a systemic review Doença de Chagas . O que é conhecido e o que deve ser melhorado : uma visão sistêmica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(3):286–96.
12. Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Dec;108(8):962–7.
13. Coura, José Rodrigues and Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):5–13.
14. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Oct;24(4):655–81.
15. Carlos J, Dias P, Neto VA, Albuquerque J De. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):375–9.
16. Andrade D V, Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Jul;8(7):e3010.
17. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007 Mar 6;115(9):1109–23.
18. Menezes Cristiane, Costa Germano C GKJ and DWO. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. *Drug Dev Res.* 2011;72(6):471–9.
19. Dutra WO, Alves C, Menezes S, Nobre F, Villani A, Carneiro G, et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:208–18.
20. Botoni F a, Ribeiro ALP, Marinho CC, Lima MMO, Nunes MDCP, Rocha MOC. Treatment of Chagas cardiomyopathy. *Biomed Res Int.* 2013 Jan;2013:849504.

21. Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, Baylón-Pacheco L, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA, et al. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta Trop. Elsevier B.V.*; 2013 Aug;127(2):126–35.
22. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Feb;71(4):549–74.
23. Tassi EM, Continentino MA, Nascimento EM Do, Pereira BDB, Pedrosa RC. Relationship between Fibrosis and Ventricular Arrhythmias in Chagas Heart Disease Without Ventricular Dysfunction. *Arq Bras Cardiol.* 2014;(December 2010):456–64.
24. Lepesheva GI. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: What shows the most promise? *Expert Opin Drug Discov.* 2013;8(12):1–17.
25. Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther.* 2010 Sep;4:243–53.
26. Marin-neto JA, Jr AR, Jr AA, Mattos AC, Rassi A. The BENEFIT trial : testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(June):319–24.
27. Diniz LDF, Urbina J a, de Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TAF, Caldas IS, et al. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jan;7(8):e2367.
28. Ndao M, Beaulieu C, Black WC, Isabel E, Vasquez-Camargo F, Nath-Chowdhury M, et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jan;58(2):1167–78.
29. M. N. C. Soeiro¹, K. Werbovetz, D.W. Boykin, W. D. Wilson, M. Z. Wang and AH. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology.* 2013;140(8).

30. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014 May 15;370(20):1899–908.
31. Villalta F, Dobish MC, Nde PN, Kleshchenko YY, Hargrove TY, Johnson C a, et al. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. *J Infect Dis*. 2013 Aug 1;208(3):504–11.
32. Keenan M, Chaplin JH, Alexander PW, Abbott MJ, Best WM, Khong A, et al. Two analogues of fenarimol show curative activity in an experimental model of Chagas disease. *J Med Chem*. 2013 Dec 27;56(24):10158–70.
33. Calvet CM, Vieira DF, Choi JY, Kellar D, Cameron MD, Siqueira-neto JL, et al. 4 - Aminopyridyl-Based CYP51 Inhibitors as Anti- *Trypanosoma cruzi* Drug Leads with Improved Pharmacokinetic Profile and in Vivo Potency. *J Med Chem*. 2015;57:6989–7005.
34. Vieira DF, Choi JY, Calvet CM, Siqueira-neto JL, Johnston JB, Kellar D, et al. Binding Mode and Potency of N-Indolyloxopyridinyl-4- aminopropanyl-Based Inhibitors Targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51. *J Med Chem*. 2014;
35. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob K, Teixeira M, Factor SM, et al. Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(6):753–70.
36. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jul;24(3):592–630.
37. Marcon GEB, Albuquerque DM De, Batista AM, Andrade PD, Almeida EA, Guariento ME, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(February):85–91.

38. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. 2010;323–31.
39. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4195–200.
40. Brown Bryan N and Badylak Stephen F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Transl Res.* 2014;163(4):268–85.
41. Kim S-H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011 May;209(2):139–51.
42. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2014 Nov 5;15(12):771–85.
43. Bradshaw MJ, Smith ML. Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta Biomater.* Acta Materialia Inc.; 2014 Apr;10(4):1524–31.
44. Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 2005 Sep;24(6):389–99.
45. Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin: Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Sep 1;18(9):1363–70.
46. Moretti F a, Chauhan AK, Iaconcig A, Porro F, Baralle FE, Muro AF. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem.* 2007 Sep 21;282(38):28057–62.
47. Singh Purva CC and SJE. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:397–419.

48. Ilić D, Kovacic B, Johkura K, Schlaepfer DD, Tomasević N, Han Q, et al. FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J Cell Sci.* 2004 Jan 15;117(Pt 2):177–87.
49. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007 May 1;74(2):184–95.
50. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair.* *Fibrogenesis & Tissue Repair*; 2012 Jan;5(1):15.
51. Tassi EM, Continentino MA, Nascimento EM Do, Pereira BDB, Pedrosa RC. Relationship between Fibrosis and Ventricular Arrhythmias in Chagas Heart Disease Without Ventricular Dysfunction. *Arq Bras Cardiol.* 2014;(December 2010):456–64.
52. Soares MBP, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR, et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis.* 2010 Aug 15;202(3):416–26.
53. Deb A, Ubil E. Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J Mol Cell Cardiol.* Elsevier Ltd; 2014 May;70:47–55.
54. Shinde A V, Frangogiannis NG. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol.* Elsevier Ltd; 2014 May;70:74–82.
55. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6).
56. Fujii K, Nagai R. Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* Elsevier Ltd; 2014 May;70:64–73.
57. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int.* 2014 Oct 8;

58. Ceafalan LC, Popescu BO, Hinescu ME. Cellular players in skeletal muscle regeneration. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014 Jan;2014:957014.
59. Rossi S, Stoppani E, Gobbo M, Caroli A, Fanzani A. L6E9 myoblasts are deficient of myostatin and additional TGF-beta members are candidates to developmentally control their fiber formation. *J Biomed Biotechnol*. 2010 Jan;2010:326909.
60. Lee S. Regulation on muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:61–86.
61. Monteón VM, Furuzawa-Carballeda J, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Rosales-Encina JL RP. American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp Parasitol*. 1996;83(3):267–2774.
62. Maldonado IRSC, Ferreira ML, Camargos ERS, Chiari E, Machado CRS. Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi* -induced myositis in rats. 2004;85–93.
63. Zhang L TR. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chaga's disease. *J Infect Dis*. 1999;180(2):480–6.
64. Maldonado IRSC, Ferreira ML, Camargos ERS, Chiari E, Machado CRS. Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi* -induced myositis in rats. 2004;85–93.
65. Buckner FS, Wilson AJ. Detection of Live *Trypanosoma cruzi* in Tissues of Infected Mice by Using Histochemical Stain for β -Galactosidase. *Infect Imunity*. 1999;67(1):403–9.
66. Zhao B, Chen Y-G. Regulation of TGF- β Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)*. Hindawi Publishing Corporation; 2014 Jan;2014:874065.
67. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Oct;11(10):790–811.

68. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2012 Oct;13(10):616–30.
69. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, et al. Latent TGF- β structure and activation. *Nature.* Nature Publishing Group; 2011 Jun 16;474(7351):343–9.
70. Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4;280(9):7409–12.
71. Massagué J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 2006 May 22;580(12):2811–20.
72. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* 2010;19(1):128–39.
73. Mu Y, Gudey SK LM. Non-SMAD signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 2012;347(1):11–20.
74. Engel ME, McDonnell M a., Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK Signaling in Transforming Growth Factor- mediated Transcription. *J Biol Chem.* 1999 Dec 24;274(52):37413–20.
75. Moustakas A, Heldin C-H. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573–84.
76. Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-moreno AM, Xavier S, Higuchi MDL, Keramidas M, et al. Implication of Transforming Growth Factor – β 1 in Chagas Disease Myocardopathy. *J Infect Dis.* 2002;186:1823–8.
77. Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Soeiro MDNC, Keramidas M, Bailly S, Feige J-J. Pivotal role for TGF- β in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(5-6):405–13.

78. Ming M, Ewen ME, Pereira MEA, Street W. Trypanosome Invasion of Mammalian Cells Requires Activation of the TGF β Signaling Pathway. 1995;82:287–96.
79. Hall BS, Pereira MA. Dual Role for Transforming Growth Factor β -Dependent Signaling in *Trypanosoma cruzi* Infection of Mammalian Cells. 2000;68(4):2077–81.
80. Waghbi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazaré C Soeiro M, Mendonça-Lima L, et al. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Aug;51(8):2905–10.
81. Waghbi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Nazare M De, Meirelles MDNL, et al. Uptake of Host Cell Transforming Growth Factor- β by *Trypanosoma cruzi* Amastigotes in Cardiomyocytes Potential Role in Parasite Cycle Completion. 2005;167(4):993–1003.
82. Martin DL, Postan M, Lucas P, Gress R, Tarleton RL. TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol*. 2007 Oct;37(10):2764–71.
83. Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SADL, Teixeira VDPA, Tostes S, et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol*. 2012 Jan;2012:361730.
84. Waghbi MC, Coutinho-silva R, Feige J, Higuchi MDL, Becker D, Burnstock G, et al. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor- β treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(December):1083–90.
85. Waghbi MC, Keramidas M, Feige J-J, Araujo-Jorge TC, Bailly S. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*. 2005 Apr;7(4):511–7.

86. Waghbi MC, Coutinho CMLM, Soeiro MNC, Pereira MCS, Feige J, Keramidas M, et al. Increased *Trypanosoma cruzi* Invasion and Heart Fibrosis Associated with High Transforming Growth Factor β_1 Levels in Mice Deficient in α_2 - Macroglobulin. *Infect Immun*. 2002;70(9):5115–23.
87. De Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige J-J, et al. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan;6(6):e1696.
88. Waghbi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC BS. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(11):4694–701.
89. Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MNL, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitol*. 2004;107(1-2):20–30.
90. Calvet CM, Oliveira FOR, Araújo-Jorge TC, Pereira MCS. Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int J Med Microbiol*. 2009 Apr;299(4):301–12.
91. Leask A. TGF β , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res*. 2007 May 1;74(2):207–12.
92. Igotz RA MJ. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell*. 1987;51(2):189–97.
93. Pereira PCM, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2013 Jan;19(1):34.
94. Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Oct;3(10):819–23.

95. Meirelles MN, de Araujo-Jorge TC, Miranda CF, de Souza W BH. 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.* 1986;41(2):198–206.
96. Montesano R, Carrozzino F, Soulié P. Low concentrations of transforming growth factor-beta-1 induce tubulogenesis in cultured mammary epithelial cells. *BMC Dev Biol.* 2007 Jan;7:7.
97. Calvet CM, Oliveira FOR, Araújo-Jorge TC, Pereira MCS. Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int J Med Microbiol.* 2009 Apr;299(4):301–12.
98. Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MID, Borojevic R, de Meirelles MDNL. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis.* 2008 Mar 15;197(6):906–15.
99. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF- β signaling by Smad7 Overview of TGF- β Signaling Pathways. 2009;263–72.
100. Igotz RA MJ. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1986;261(9):4337–45.
101. Kapoun AM, Liang F, O'Young G, Damm DL, Quon D, White RT, Munson K, Lam A, Schreiner GF PA. B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res.* 2004;94(4):453–6.
102. L. García-Pozo, M.E. Miquilena-Colina TL-R and CG-M. Endoglin : structure , biological functions and role in fibrogenesis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 2008;401:355–60.

103. Rodríguez-barbero A, Obreo J, Álvarez-muñoz P. Cellular Physiology and Biochemistry Endoglin Modulation of TGF- β 1-Induced Collagen Synthesis is Dependent on ERK1 / 2 MAPK Activation. 2006;135–42.
104. Kapur NK, Wilson S, Yunis A a, Qiao X, Mackey E, Paruchuri V, et al. Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation*. 2012 Jun 5;125(22):2728–38.
105. Chen K, Zhang X, Hermonat PL MJ. Anoxia-reoxygenation stimulates collagen type-I and MMP-1 expression in cardiac fibroblasts: modulation by the PPAR-gamma ligand pioglitazone. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44(6):682–7.
106. Melo TG, Tucci AR, Nogueira AR, Meirelles MDNSL, Pereira MCS. The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. Elsevier Inc.; 2014 Apr;139:49–57.
107. Nazareth M De, Meirelles L De, Pereira MCS, Singer RH, Soeiro MDNC, Garzoni LR, et al. *Trypanosoma cruzi* -cardiomyocytes: New Contributions Regarding a Better Understanding of this Interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(1):149–52.
108. Pereira MC, Singer RH de MM. Ultrastructural distribution of poly (A)+ RNA during *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction in vitro: a quantitative analysis of the total mRNA content by in situ hybridization. *J Eukaryot Microbiol*. 2000;47(3):264–70.
109. Machado FS, Martins G a., Aliberti JCS, Mestriner FL a. C, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. *Circulation*. 2000 Dec 12;102(24):3003–8.
110. Sun M, Chen M, Dawood F, Zurawska U, Li JY, Parker T, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation*. 2007 Mar 20;115(11):1398–407.

111. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*. 2006 May;118(1):10–24.
112. Mott GA, Costales J a, Burleigh B a. A soluble factor from *Trypanosoma cruzi* inhibits transforming growth factor- β -induced MAP kinase activation and gene expression in dermal fibroblasts. *PLoS One*. 2011 Jan;6(9):e23482.
113. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol*. 2004 Apr;85(2):47–64.
114. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming Growth Factor- β Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. 2002;211–5.
115. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C RA. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol*. 1999;1(5):260–6.
116. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1358–75.
117. Dziembowska M, Danilkiewicz M, Wesolowska A, Zupanska A, Chouaib S, Kaminska B. Cross-talk between Smad and p38 MAPK signalling in transforming growth factor beta signal transduction in human glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 23;354(4):1101–6.
118. Waghbi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Nazare M De, Meirelles MDNL, et al. Uptake of Host Cell Transforming Growth Factor- β by *Trypanosoma cruzi* Amastigotes in Cardiomyocytes Potential Role in Parasite Cycle Completion. 2005;167(4):993–1003.
119. Stempin CC, Garrido V V, Dulgerian LR, Cerbán FM. Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages. *Acta Trop*. 2008 May;106(2):119–27.

120. Morales MG, Vazquez Y, Acuña MJ, Rivera JC, Simon F, Salas JD, Alvarez Ruf J, Brandan E C-VC. Angiotensin II- induced pro-fibrotic effects require p38MAPK activity and transforming growth factor beta 1 expression in skeletal muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):1993–2002.
121. Li L, Fan D, Wang C, Wang J-Y, Cui X-B, Wu D, et al. Angiotensin II increases periostin expression via Ras/p38 MAPK/CREB and ERK1/2/TGF- β 1 pathways in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2011 Jul 1;91(1):80–9.
122. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun.* 2012 Jan;3:735.
123. Leask A. Focal Adhesion Kinase: A Key Mediator of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Fibroblasts. *Adv wound care.* 2013 Jun;2(5):247–9.
124. He H, Li H, Lin A, Gottlieb RA. Activation of the JNK pathway is important for cardiomyocyte death in response to simulated ischemia. *Cell Death Differ.* 1999;6:987–91.
125. Sumiyo Kudoh, Issei Komuro, Takehiko Mizuno, Tsutomu Yamazaki, Younzeng Zou, Ichiro Shiojima, Noboru Takekoshi YY. Angiotensin II Stimulates c-Jun NH2-Terminal Kinase in Cultured Cardiac Myocytes of Neonatal Rats. *Circ Res.* 1997;80:139–46.
126. Wang Y, Su B, Sah VP, Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac Hypertrophy Induced by Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7 , a Specific Activator for c-Jun NH 2 -terminal Kinase in Ventricular Muscle. *J Biol Chem.* 1998;273:5423–6.
127. Hocevar BA, Brown TL, Howe PH. TGF- β induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J.* 1999;18(5):1345–56.

128. Itoh S, Thorikay M, Kowanetz M, Moustakas A, Itoh F, Heldin C-H, et al. Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3751–61.
129. Liu S, Shi-wen X, Kennedy L, Pala D, Chen Y, Eastwood M, et al. FAK Is Required for TGF- β -induced JNK Phosphorylation in Fibroblasts : Implications for Acquisition of a Matrix-remodeling Phenotype. *Mol Biol Cell.* 2007;18(June):2169–78.