

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO CARDÍACA  
APÓS INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE TGF- $\beta$  EM MODELO EXPERIMENTAL  
DE DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

**RAYANE DA SILVA ABREU**

Rio de Janeiro  
Setembro de 2017

Abreu, Rayane da Silva.

Avaliação do potencial de regeneração cardíaca após inibição da atividade de TGF-beta em modelo experimental de doença de Chagas crônica / Rayane da Silva Abreu. - , 2017.

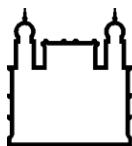
88 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Mariana Caldas Waghbi.

Bibliografia: f. 61-74

1. Doença de Chagas. 2. Fibrose. 3. TGF-beta. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***RAYANE DA SILVA ABREU***

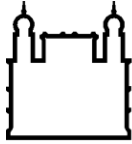
Avaliação do potencial de regeneração cardíaca após inibição da atividade de TGF- $\beta$  em modelo experimental de doença de Chagas crônica

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

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Mariana Caldas Waghbi

**RIO DE JANEIRO**

Setembro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: RAYANE DA SILVA ABREU**

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO CARDÍACA APÓS  
INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE TGF- $\beta$  EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

**ORIENTADOR (ES): Dr<sup>a</sup>. MARIANA CALDAS WAGHABI**

Aprovada em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Mirian Claudia Pereira – **Presidente** (Laboratório de Ultra-Estrutura Celular / IOC)

**Prof. Dr.** Otacílio da Cruz Moreira (Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas / IOC)

**Prof. Dra.** Adriana Bastos Carvalho (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / UFRJ)

**Prof. Dra.** Elen Mello de Souza (Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral / IOC)

**Prof. Dr.** Wagner Baetas da Cruz (Centro de Cirurgia Experimental / UFRJ)

Rio de Janeiro, 01 de setembro  
de 2017

Dedico este trabalho a minha família,  
minha base e porto seguro,  
por todo apoio e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por minha vida, por me conceder forças para superar os obstáculos, por me abençoar e me sustentar nesta caminhada, permitindo que chegasse até aqui.

À minha mãe, Eliane, por todo amor e apoio incondicional, pela dedicação sem limites, por ser a minha fortaleza e grande incentivadora, me faltam palavras para mensurar a importância de tudo que fez e faz por mim. Você é o meu maior exemplo e orgulho.

Ao meu pai, Raimundo, por tanto me instruir sobre a vida, por me ensinar a importância de se dedicar aos estudos e lutar pelos meus objetivos. Você é meu exemplo de esforço e perseverança.

À minha irmã, Laryssa, por ser além de irmã, minha amiga e companheira. Obrigada por todo apoio e torcida.

Ao meu grande companheiro, Fellipe, meu amor, amigo e parceiro de todos os dias. Obrigada por todo apoio, dedicação e paciência, por ser meu grande incentivador, torcer e se alegrar com as minhas conquistas como se fossem as suas. Tenho certeza que não poderia ter escolhido melhor companheiro pra minha vida.

À Dra. Mariana Waghbi, pelos ensinamentos diários que tanto são essenciais para a minha formação, transmitindo o entusiasmo e amor pela pesquisa. Obrigada por ser este exemplo de profissional, por todo incentivo e paciência e especialmente, obrigada pela oportunidade e confiança para a realização deste trabalho.

À Dra. Elen Mello, pela excelente e criteriosa revisão deste trabalho. Obrigada por toda atenção, mais uma vez.

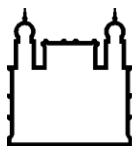
Ao Roberto, grande companheiro de bancada que tanto me ensinou, compartilhar a bancada, a sala e o conhecimento com você têm sido um grande prazer, e agora mesmo distante se faz sempre presente. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do dia-a-dia: João, Aline, Sindy, Renata Maia, Paloma, Bia, Helena, Pamela, Juliana, Alessandra, Renata Almeida, D. Neiva e D. Sônia, enfim todos do LAGFB. Obrigada por todas as ajudas, conversas, risadas, almoços e festinhas. Compartilhar meus dias com vocês é um grande prazer.

A todos os meus amigos, apesar da correria do dia-a-dia que nos afastam, estão sempre presentes. Obrigada pela compreensão e torcida.

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

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), CNPq, Inserm e DECIT pelo apoio financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

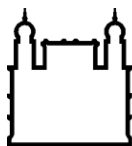
Fundação Oswaldo Cruz

## AValiação DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO CARDÍACA APÓS INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE TGF- $\beta$ EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

### RESUMO

Estudos publicados pelo grupo demonstram o envolvimento do TGF- $\beta$  na cardiopatia chagásica. A deposição excessiva de componentes de matriz extracelular (MEC) induz o processo fibrótico que leva ao comprometimento funcional do coração e o TGF- $\beta$  se destaca como uma das principais proteínas reguladoras desse processo. As metaloproteases atuam degradando a MEC, e estão diretamente envolvidas no remodelamento cardíaco, tendo sua atividade controlada por TIMPs. Dados paralelos do grupo indicam que animais infectados por *T. cruzi* durante a fase crônica experimental da doença de Chagas, apresentaram acometimento cardíaco, aumento da expressão e deposição de colágeno no coração e aumento dos níveis circulantes de TGF- $\beta$ . O tratamento com o composto GW788388, inibidor da atividade de TGF- $\beta$ , 120 dias pós-infecção (dpi), foi capaz de: melhorar a condução elétrica cardíaca; reverter a expressão e deposição de colágeno no tecido cardíaco; e diminuir os níveis circulantes do TGF- $\beta$ . O objetivo deste estudo é compreender os mecanismos envolvidos na reversão da fibrose após o tratamento com GW788388, e avaliar possíveis candidatos envolvidos na regeneração cardíaca, durante a fase crônica da doença de Chagas experimental. Para isso, animais C57Bl/6 foram infectados com *T. cruzi* Cepa colombiana ( $10^2$ ) e tratados com 3 mg/kg GW788388, após 120 dpi em dois diferentes esquemas de tratamento: i) 1x por semana ou ii) 3x por semana por via oral, durante 30 dias (até 150 dpi). O coração dos animais foi retirado e proteínas e RNA totais foram extraídos para investigação da expressão de MMP-2 e MMP-9 (*RT-qPCR* e *Western blot*), assim como suas atividades proteolíticas (*Zimografia*). Além disso, também foi investigada a expressão de TIMPs -1, -2 e -4 e troponina T por *Western blot*; e a expressão gênica de marcadores de regeneração cardíaca: Gata-4, Gata-6, T-box5, Nkx2-5, troponina T, desmina e titina por *RT-qPCR*. Técnicas histológicas foram utilizadas para avaliação de Cx43. Além disso, foram avaliados os níveis de TIMP-1 circulantes por ELISA. Nossos resultados demonstram que a infecção crônica leva à desorganização de Cx-43 e o tratamento recupera o padrão de Cx-43. Foi observada diminuição da atividade de MMP-2 e -9 com a infecção crônica e o tratamento com GW788388 aumentou suas atividades no coração dos animais. Os níveis de TIMP-1 circulantes aumentam em 120 dias após a infecção e caem 150 dias após a infecção, o tratamento com GW788388 aumenta esses níveis. Entretanto, a expressão cardíaca dos TIMPs -1, -2 e -4 aumentam em 150 dpi e o tratamento com GW788388 reverte esse aumento. A infecção crônica leva a diminuição da expressão de todos os marcadores de regeneração cardíaca avaliados, e o tratamento com GW788388 3x por semana aumentou a expressão de Gata-6 e T-box5. Nossos dados indicam que a reversão da fibrose cardíaca é mediada pela regulação da atividade de MMP-2, -9 por TIMPs. Além disso, o tratamento com GW788388 parece ser capaz de induzir regeneração cardíaca em animais cronicamente infectados, sendo promissor como uma nova possibilidade de tratar a fibrose cardíaca observada na fase crônica da doença de Chagas.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EVALUATION OF POTENTIAL CARDIAC REGENERATION AFTER THE INHIBITION OF TGF- $\beta$ ACTIVITY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC CHAGAS DISEASE

#### ABSTRACT

Studies published by our group demonstrate the involvement of TGF- $\beta$  in Chagas' heart disease. The excessive deposition of extracellular matrix components (ECM) induces the fibrotic process resulting in functional commitment of the heart and TGF- $\beta$  stands out one of the main regulatory proteins of this process. The metalloproteases degrade ECM and are directly involved in cardiac remodeling, and their activity is controlled by TIMPs. Concomitant data from the group indicates that *T. cruzi* infected animals during the experimental chronic phase of Chagas' disease presented cardiac damage, increased expression and deposition of collagen in the heart and increased levels of circulating TGF- $\beta$ . Treatment of the animals with the compound GW788388, inhibitor of TGF- $\beta$  activity, 120 days post infection (dpi), was able to: improve cardiac electrical conduction; reverse expression and deposition of collagen in cardiac tissue; and decrease circulating levels of TGF- $\beta$ . The aim of this study is to understand the mechanisms involved in the reversal of fibrosis after treatment with GW788388, and to evaluate possible candidates involved in cardiac regeneration during the chronic phase of experimental Chagas' disease. For this, C57Bl/6 animals were infected with *T. cruzi* Colombian strain ( $10^2$ ) and treated orally with 3mg / kg GW788388, after 120 days of infection in two different treatment regimens: i) once a week or ii) 3 times a week during 30 days (150 dpi). The animals' hearts were removed and total proteins and total RNA were extracted for investigation of the MMP-2 and MMP-9 expression (RT-qPCR and Western blot), as well as their proteolytic activities (Zymography). Also, the expression of TIMPs -1, -2 and -4 and troponin T was investigated by Western blot; and the gene expression of cardiac regeneration markers: Gata-4, Gata-6, T-box5, Nkx2-5, troponin T, desmin and titin by RT-qPCR. Histological techniques were used to evaluate Cx43. In addition, the levels of circulating TIMP-1 were evaluated by ELISA. Our results demonstrate that the chronic infection induces to disorganization of Cx-43 and the treatment recovers the Cx-43 pattern. A reduction in MMP-2 and -9 activity was observed with the chronic infection and the treatment with GW788388 increased its activities in the animals' hearts. Circulating TIMP-1 levels increase at 120 days post-infection and fall 150 days post-infection, treatment with GW788388 increases these levels. The expression of TIMPs -1, -2 and -4 increase at 150 dpi and the treatment with GW788388 reduces these expression. Chronic infection leads to decreased expression of all assessed cardiac regeneration markers, and increased expression of Gata-6 and T-box5 was observed in the treatment with GW788388 3x a week. Our data indicate that cardiac fibrosis reversion is mediated by the regulation of MMP -2 and -9 activity by TIMPs. In addition, the treatment with GW788388 appears to be able to induce cardiac regeneration in chronically infected animals and is promising as a new possibility of treating cardiac fibrosis observed in the chronic phase of Chagas' disease.

# ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A doença de Chagas</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Agente etiológico: <i>Trypanossoma cruzi</i> .....	1
1.1.2 Epidemiologia da doença de Chagas.....	4
1.1.3 Evolução clínica da doença.....	6
1.1.4 Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC).....	7
1.1.5 Tratamentos.....	9
<b>1.2 Fator transformador de crescimento beta (TGF-<math>\beta</math>)</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Superfamília TGF- $\beta$ .....	11
1.2.2 Funções, estrutura e ativação .....	12
1.2.3 Vias de sinalização.....	14
1.2.4 TGF- $\beta$ e fibrose .....	15
1.2.5 TGF- $\beta$ na doença de Chagas.....	16
1.2.6 Compostos anti-TGF- $\beta$ na doença de Chagas.....	19
<b>1.3 Regulação da matriz extracelular: MMPs e TIMPs</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4 Regeneração cardíaca</b> .....	<b>24</b>
<b>1.5 Justificativa</b> .....	<b>26</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Composto</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2 Modelo experimental</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3 Grupos experimentais e tratamento</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4 Obtenção do soro</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 Dosagem dos níveis séricos de TIMP1</b> .....	<b>30</b>

3.6	Coleta de tecidos.....	30
3.7	Imunohistologia e quantificação de placas de Cx-43 .....	30
3.8	Extração e dosagem de proteínas .....	31
3.9	Eletroforese .....	32
3.10	Transferência.....	32
3.11	Wertern Blot.....	33
3.12	Zimografia.....	33
3.13	Extração e dosagem de RNA.....	34
3.14	RT-qPCR.....	35
3.15	Análises estatísticas .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
4.1	<b>Investigação do papel de Conexina-43 e sua possível relação na recuperação da condução do impulso elétrico após tratamento com GW788388.....</b>	<b>36</b>
4.1.1	Avaliação da organização de Cx-43.....	36
4.1.2	Análise do comprimento das placas de CX-43.....	38
4.2	<b>Investigação dos mecanismos envolvidos na reversão da fibrose cardíaca após tratamento com GW788388.....</b>	<b>39</b>
4.2.1	Avaliação da expressão gênica de MMP-2 e MMP-9.....	39
4.2.2	Avaliação da expressão proteica de MMP-2.....	41
4.2.3	Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9 .....	42
4.2.4	Avaliação dos níveis circulantes de TIMP-1 .....	42
4.2.5	Avaliação da expressão cardíaca de TIMPs .....	44
4.3	<b>Investigação do potencial de regeneração cardíaca após tratamento com GW788388.....</b>	<b>46</b>
4.3.1	Análise da expressão gênica de marcadores de regeneração cardíaca .....	46
4.3.2	Avaliação da expressão proteica de Troponina T .....	49
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Ciclo biológico do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
Figura 1.2: Distribuição global da doença de Chagas .....	5
Figura 1.3: Manifestações clínicas da doença de Chagas aguda .....	6
Figura 1.4: Acometimentos cardíacos característicos da doença de Chagas crônica .....	8
Figura 1.5: Representação esquemática dos membros da Superfamília TGF- $\beta$ em mamíferos .....	12
Figura 1.6: Complexo TGF- $\beta$ latente .....	13
Figura 1.7: Via de sinalização clássica do TGF- $\beta$ .....	15
Figura 1.8: Inibidores farmacológicos da via de sinalização de TGF- $\beta$ .....	21
Figura 1.9: Estrutura das metaloproteases 9 e 2.....	23
Figura 3.1: Estrutura química do composto GW788388 .....	28
Figura 4.1: Organização de Cx-43 no coração dos camundongos .....	37
Figura 4.2: Gráfico representando o comprimento de placas de Cx-43 no tecido cardíaco dos camundongos.....	38
Figura 4.3: Avaliação da expressão gênica de MMP-2 e MMP-9 no coração dos camundongos.....	40
Figura 4.4: Avaliação da expressão proteica de MMP-2 .....	41
Figura 4.5: Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9 em extrato proteico do coração dos camundongos.....	43
Figura 4.6: Gráfico dos níveis circulantes de TIMP-1 no soro dos camundongos .....	44
Figura 4.7: Avaliação da expressão de TIMPs no coração dos camundongos.. ..	45
Figura 4.8: Avaliação da expressão gênica de marcadores de regeneração cardíaca: GATA-4, NKX2-5, Titina, Troponina T e Desmina no coração dos camundongos.....	47
Figura 4.9: Avaliação da expressão gênica de marcadores de regeneração cardíaca: GATA-6 e T-Box5 no coração dos camundongos .....	48
Figura 4.10: Avaliação da expressão proteica de Troponina T no coração dos camundongos.....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1 Relação dos grupos experimentais.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabela 3.2 Anticorpos primários e secundários.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAV – bloqueio átrio ventricular  
BFAE – bloqueio fascicular anterior esquerdo  
BMP – proteína morfogênica do osso  
BRD – bloqueio de ramo direito  
Bz – benznidazol  
CCC – cardiomiopatia chagásica crônica  
CT – célula tronco  
Cx-43 – conexina-43  
DC – doença de Chagas  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
ECG – eletrocardiograma  
ERK – quinases ativadas por mitógenos  
GDF – fator de diferenciação e crescimento  
GDNF – fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais  
h – hora  
hESCs – células tronco embrionárias humanas  
IFN- $\gamma$  – interferon gama  
JNK – C-Jun N-terminal quinase  
kDa – quilodalton  
LAGFB – Laboratório de Genômica funcional e Bioinformática  
LAP – peptídeo associado à latência  
LTBP – proteína de ligação à TGF- $\beta$  latente  
LTGF- $\beta$  – TGF- $\beta$  latente  
MEC – matriz extracelular  
MIS – substância inibidora Mülleriana  
mL – mililitro  
mM – milimolar  
MMP – metaloproteinase de matriz  
MSC – células tronco mesenquimais  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
p38 – proteínas quinases ativadas por mitógeno  
PAI-I – inibidor do ativador do plasminogênio

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucleico

RT-qPCR – transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase quantitativa

rpm – rotações por minuto

SDF-1 $\alpha$  – fator de derivação estromal-1 $\alpha$

*T. cruzi* – *Trypanossoma cruzi*

TGF- $\beta$  – fator transformador de crescimento beta

T $\beta$ RI – receptor de TGF- $\beta$  do tipo I

T $\beta$ RII – receptor de TGF- $\beta$  do tipo II

T $\beta$ RIII – receptor de TGF- $\beta$  do tipo III

TIMP – inibidor de metaloproteinases de tecido

u-PA – uroquinase ativador do plasminogênio

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

$\mu$ g – micrograma

$\mu$ L – microlitro

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, descrita em 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas, que caracterizou o agente etiológico, bem como seu ciclo biológico, e os aspectos clínicos e epidemiológicos associados à doença (Chagas, 1909). Também conhecida como tripanossomíase Americana, a doença é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que tem como vetor o inseto triatomíneo, conhecido como barbeiro (OMS, 2017).

### 1.1.1 O agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário da Ordem Kinetoplastida, que pertence à Família Trypanosomatidae, um grupo de parasitas flagelados capazes de causar doenças em humanos. O *T. cruzi* é caracterizado pela presença de um flagelo e cinetoplasto (organela que contém DNA e localizada na mitocôndria). Ao longo de seu ciclo de vida, são observadas três distintas formas evolutivas (amastigota, epimastigota e tripomastigota) que podem ser identificadas baseadas na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo. As formas amastigotas, são as formas multiplicativas encontradas no interior das células de hospedeiros vertebrados, apresentam formato arredondado e flagelo pouco aparente. Formas epimastigotas apresentam formato fusiforme com cinetoplasto e flagelo localizados anteriormente ao núcleo, são formas multiplicativas encontradas no trato digestivo dos insetos vetores. Nas formas tripomastigotas, forma infectante e não replicativa, o cinetoplasto e o flagelo estão localizados posteriormente ao núcleo e apresentam um formato alongado (Brener, 1997; de Souza, 2002).

Apresentando uma ampla heterogeneidade, o *T. cruzi*, é atualmente classificado em seis grupos diferentes, denominados “unidades de tipagem distintas” (DTUs), sendo essas DTUs divididas em TcI a TcVI (*T. cruzi* I – VI)



(Zingales, et al 2009). Estas unidades apresentam distribuição geográfica variável e extensa diversidade genética, e alguns estudos sugerem ainda uma correlação das seis DTUs com a ocorrência das diferentes patologias crônicas da doença de Chagas (Álvarez et al., 2014; Steverding, 2014). Entretanto, essa associação entre as DTUs e a forma clínica da doença ainda é controversa, visto que até o momento não há dados que comprovem esta associação (Zingales, et al., 2012). Além disso, já foram relatados casos de infecções mistas por *T. cruzi* de diferentes DTUs em humanos, animais reservatórios e triatomíneos, demonstrando a sobreposição de DTUs em uma mesma região geográfica e sugerindo que a gravidade dos sintomas na doença pode ser atribuída a co-infecção por *T. cruzi* com genótipos de diferentes DTUs (Hernández et al., 2014; 2016a; 2016b).

O ciclo de vida do *T. cruzi*, esquematizado na figura 1.1, envolve estágios de desenvolvimento no trato digestivo de insetos vetores e no sangue e tecidos de mamíferos hospedeiros. A infecção do inseto vetor ocorre a partir do sangue humano ou de qualquer outro mamífero contaminado, ao sugar este sangue o inseto ingere então as formas tripomastigotas sanguíneas do parasita. No intestino médio do vetor, os tripomastigotas se diferenciam na forma epimastigota, que são capazes de se replicar por fissão binária. Na porção posterior do intestino, as formas epimastigotas se diferenciam nas formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes, sendo excretadas nas fezes e urina dos triatomíneos (Muños-Saravia et al., 2010). A infecção do hospedeiro mamífero ocorre quando as formas tripomastigotas metacíclicas penetram no hospedeiro através de lesão na pele resultante da picada do inseto ou preexistente, podendo penetrar também diretamente nas mucosas da boca ou dos olhos. Uma vez que as formas tripomastigotas metacíclicas invadem as células se diferenciam em formas amastigotas e se multiplicam por fissão binária. Após vários ciclos de replicação e com as células repletas de amastigotas, ocorre novamente a diferenciação em tripomastigotas e a lise das células hospedeiras. Os parasitas liberados com o rompimento das células podem invadir células adjacentes ou alcançar a corrente sanguínea invadindo outros tecidos, principalmente células musculares cardíacas. O ciclo é reiniciado quando os tripomastigotas são ingeridos pelo inseto vetor no momento do repasto sanguíneo (de Souza, 2002; Rassi Jr et al., 2012).

A transmissão do *T. cruzi* através de vetores triatomíneos ainda é a principal via de transmissão da doença em regiões endêmicas, ocorrendo pelo contato com fezes e urina de insetos infectados, conhecidos popularmente como “barbeiros”, assim a transmissão vetorial é responsável por mais de 70% dos casos de infecção em países onde não há um controle vetorial sistemático (Coura e Dias, 2009; OMS, 2017). No Brasil, a transmissão por *Triatoma infestans*, um dos principais vetores de *T. cruzi*, foi considerada erradicada quando a Organização Pan-Americana de Saúde concedeu ao Ministério da Saúde a certificação internacional de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans* (revisto por Ferreira e Silva, 2006). Entretanto, já foi relatada o retorno desta espécie em áreas domiciliares e peridomiciliares no estado da Bahia (Araújo et al., 2014), este fato reforça a necessidade manutenção de vigilância contínua para controlar a propagação da doença de Chagas, evitando novos focos de *T. infestans*. Além disso, esta espécie vem sendo substituída por outras como, *Triatoma brasiliensis* (Nordeste), *Panstrongylus megistus* (Nordeste e Centro-Sul) e *T. sordida* e *T. pseudomaculata*. Em outros países as principais espécies são *Triatoma dimidiata* (Colômbia, Equador e América Central) e *Rhodnius prolixus* (Colômbia, Equador, Venezuela, América Central e México), além da *T. maculata* (Venezuela), *T. barberi* e *T. longipennis* (México) que vem apresentando importância crescente devido à sua presença em regiões peridomiciliares (Dias, 1993).

Nos últimos anos a transmissão oral de *T. cruzi*, através da ingestão de alimentos contaminados com o parasita, tem se tornado predominante no Brasil, devido a surtos, especialmente na Amazônia, pela ingestão do açaí e cana-de-açúcar contaminados (Nóbrega et al., 2009; Dias et al., 2011). O parasite pode ainda ser transmitido, menos frequentemente, por outras vias como: transmissão congênita, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e vias acidentais (Dias e Neto, 2011).

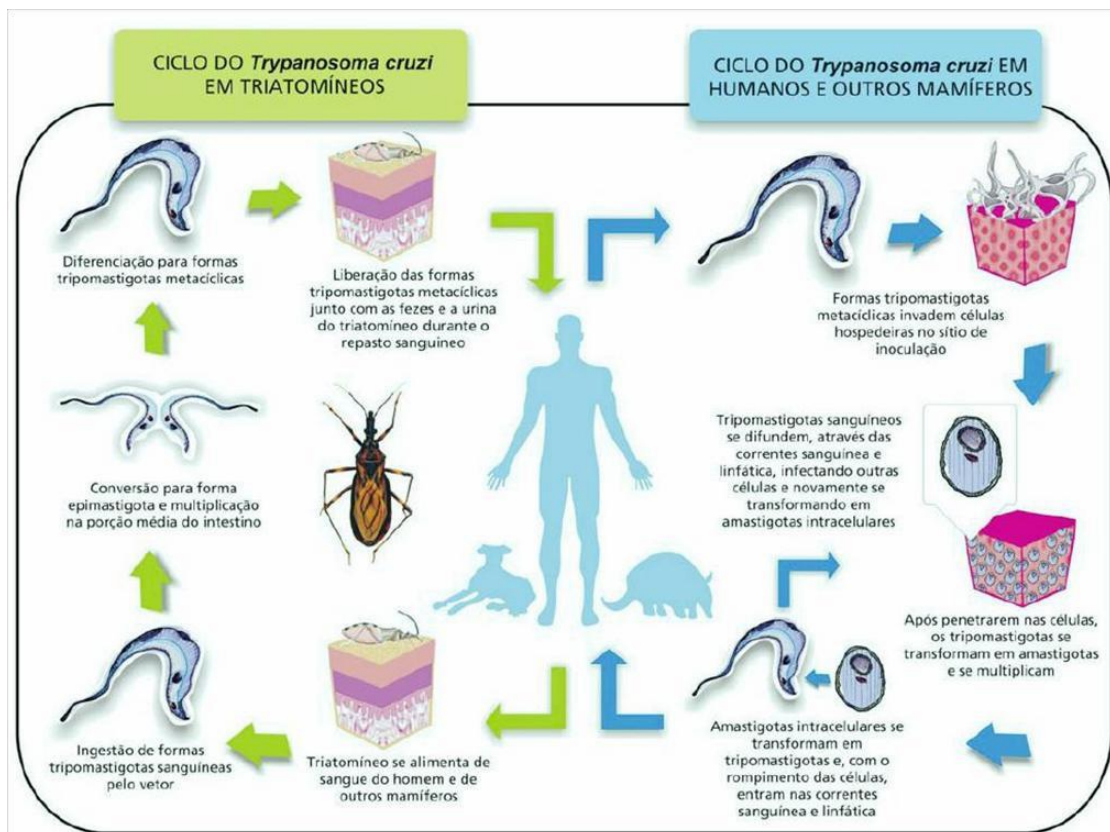


Figura 1.1: Ciclo biológico do protozoário *Trypanosoma cruzi*.  
Fonte: ICICT/FIOCRUZ

### 1.1.2. Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas ocorre principalmente em regiões endêmicas de 21 países latino-americanos onde encontra-se a maioria dos indivíduos infectados, no entanto, devido aos movimentos migratórios a doença vem se espalhando por outros continentes e atualmente estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo mundo (OMS, 2017). Este intenso movimento de globalização colaborou para o surgimento da doença de Chagas em países não endêmicos da América do Norte, Europa, Ásia e Oceania, afetando principalmente Estados Unidos, Canadá, Espanha, França, Suíça, Japão, Austrália e países emergentes da Ásia (Schmunis, 2007). Com isto, a doença de Chagas deixa de ser um problema apenas de países endêmicos tornando-se uma questão de saúde global (Figura 1.2).

Dados indicam que mais de 300 mil pessoas infectadas com *T. cruzi* residem atualmente nos Estados Unidos e, ainda que limitados, os dados epidemiológicos da Europa indicam que há mais de 100 mil casos de doença de Chagas, sendo Espanha e Itália os países mais afetados com maior ocorrência de casos. Assim, os Estados Unidos e alguns países da Europa, como Espanha, França e Reino Unido, instituiu nos bancos de sangue uma triagem abrangente para *T. cruzi*, como forma de prevenir a infecção por transfusão de sangue e transplante de órgãos (revisto por Andrade et al., 2014).

A doença de Chagas é responsável por mais de 10 mil mortes estimadas ao ano. Entretanto, apesar de sua gravidade e internacionalização, a doença de Chagas ainda segue negligenciada uma vez que ainda é associada a áreas rurais e empobrecidas, afetando majoritariamente indivíduos menos favorecidos. Dados apontam que mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e embora seja conhecido atualmente que a doença atinge também áreas urbanas e países desenvolvidos, o estigma social associado à doença de Chagas permanece forte (OMS, 2014).

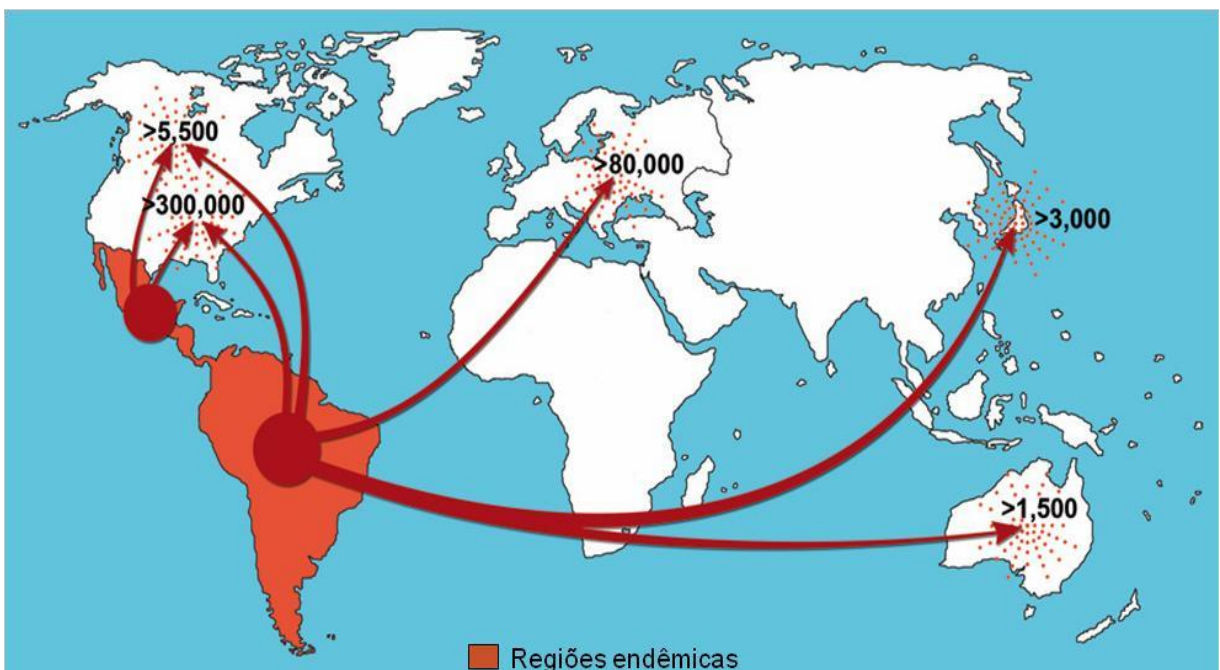


Figura 1.2: Distribuição global da doença de Chagas. Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em regiões não endêmicas. Fonte: adaptado de Coura e Viñas, 2010.

### 1.1.3. Evolução clínica da doença

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas e sucessivas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda inicia-se em 6 a 10 dias após a infecção com duração de cerca de 4 a 8 semanas (revisado por Steverding, 2014). Na maioria dos casos a fase aguda não é identificada pela ausência de sintomas ou apresenta sintomas clínicos inespecíficos, como febre e mal-estar (revisado por Steverding, 2014). Em casos menos frequentes, alguns indivíduos infectados, principalmente crianças entre 1-5 anos de idade, desenvolvem sintomas mais graves nesta fase como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, miocardite e meningoencefalite, correspondendo a maioria dos casos fatais da doença de Chagas aguda (Coura, 2007). Em alguns casos, como um sintoma específico pode ser observado um edema inflamatório no local da infecção, chagoma de inoculação, quando a picada ocorre na pele e sinal de Romaña no caso do olho ter sido a porta de entrada, ocorrendo um inchaço periorbital unilateral (Figura 1.3) (Muñoz-Saravia et al, 2010).

A fase aguda da doença de Chagas tem como uma das principais características altos níveis de parasitas na circulação sanguínea, sendo facilmente detectada através de exames de sangue (Figura 1.3). Outras características importantes observadas na fase aguda é a intensa resposta inflamatória e parasitismo de diversos tipos de células como macrófagos, células musculares estriadas, lisas e cardíacas (Chagas, 1909; Coura, 2007; Álvarez et al., 2014).



Figura 1.3: Manifestações clínicas da doença de Chagas aguda. Da esquerda para a direita: Chagoma de inoculação na superfície dorsal da mão esquerda após 21 dias de infecção; Sinal de Romaña e Parasitemia, forma tripomastigota presente em amostra sanguínea durante infecção por *T. cruzi*. Fonte: Kinoshita- Yanaga et al. 2009; Rey Parasitologia, 2ª edição; CDC.

Passada a fase aguda, o indivíduo infectado evolui para a fase crônica da doença. A doença de Chagas crônica pode se apresentar de duas formas: a indeterminada e a sintomática. A maioria dos indivíduos permanecem na forma indeterminada durante toda a fase crônica, em que os pacientes apresentam testes sorológicos e parasitológicos positivos para o *T. cruzi*, entretanto, sem alterações em exames clínicos como eletrocardiografia (Moncayo & Silveira, 2009; Tanowitz et al., 2009).

A forma sintomática é observada em cerca de 30% dos indivíduos cronicamente infectados, podendo ser observada apenas após um período de 10 a 25 anos de infecção (revisto por Steverding, 2014). Diferente da fase aguda, durante a fase crônica a parasitemia é baixa e parasitismo tissular ocorre principalmente nos músculos cardíaco e digestivo, logo os sintomas da fase crônica dividem-se em alterações cardíacas, digestivas ou mista (forma cardíaca e digestiva) (WHO, 2017).

#### 1.1.4. Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)

A CCC é a principal e mais grave manifestação da doença de Chagas crônica, representando um importante problema social em termos de custos hospitalares (revisto por Álvarez et al., 2014). A forma cardíaca da doença geralmente leva a alterações do sistema de condução elétrica, arritmias, aneurismas apicais, tromboembolismo e insuficiência cardíaca progressiva (Figura 1.4), o que pode resultar em morte súbita do indivíduo afetado (Rassi Jr. et al., 2010). No entanto, a morte súbita pode ocorrer mesmo em indivíduos assintomáticos, representando a principal causa de morte em pacientes com cardiomiopatia chagásica. A CCC também é a causa mais comum de cardiomiopatia dilatada na América Latina, representando a principal causa de morte em pacientes com idade entre 30-50 anos nas áreas endêmicas da doença de Chagas (Rassi Jr et al., 2000).

Durante a infecção crônica o parasita permanece nas células miocárdicas do hospedeiro contribuindo para os danos observados no tecido cardíaco, que

envolvem resposta inflamatória, morte celular e fibrose focalizada (Higuchi et al., 1993; Andrade, 1999; Rassi Jr. et al., 2012). Células mononucleadas que compõem a inflamação estão diretamente relacionadas ao aumento da fibrose miocárdica, por meio da produção de citocinas e fatores de crescimento, como TGF- $\beta$ , que atuam sobre fibroblastos estimulando a produção de colágeno (Rossi, 1998). Estes danos levam a diversas modificações estruturais envolvendo a reparação e remodelamento cardíaco, resultando na substituição do tecido cardíaco danificado por tecido conjuntivo, o processo fibrótico (Ihn, 2002; revisto por Zamilpa et al., 2014). Nele, os cardiomiócitos necrosados são substituídos por uma cicatriz fibrosa, correspondente ao acúmulo intersticial de colágeno, incluindo fibras individuais ou em grupos, além de um aumento da espessura destas fibras. Este remodelamento afeta a espessura da cicatriz comprometendo a contratilidade e propriedades elétricas do miocárdio (revisto por Rossi, 1991; Rossi e Ramos, 1996; Zamilpa et al., 2014).

Tendo em vista o importante envolvimento da fibrose no acometimento cardíaco durante a CCC, mecanismos envolvidos neste processo representam bons alvos para estratégias terapêuticas que possibilitem a prevenção ou reversão da fibrose como forma de melhorar o prognóstico de pacientes portadores da CCC, visto que não existem tratamentos específicos para esta fase da doença (Rossi, 1991; Rossi e Ramos, 1996).

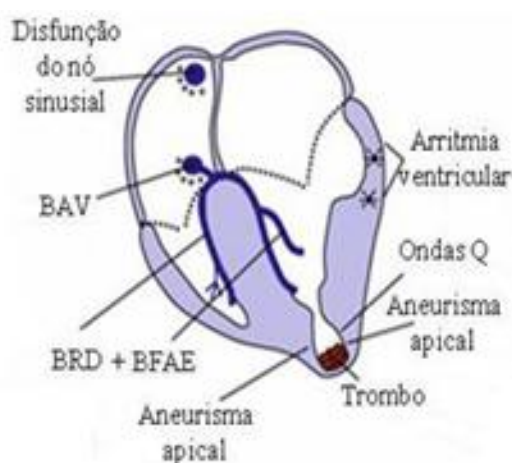


Figura 1.4: Acometimentos cardíacos característicos da doença de Chagas crônica. BAV, bloqueio átrio ventricular; BRD, bloqueio de ramo direito; BFAE, bloqueio fascicular anterior esquerdo. Fonte: adaptado de Rassi Jr, 2012.

### 1.1.5. Tratamentos

Atualmente apenas dois medicamentos tripanossomicidas são autorizados para o tratamento da doença de Chagas: Nifurtimox e Benznidazol (Bz). (Coura, 2009). Nifurtimox, também denominado Bayer 2502, quando administrado durante a fase aguda, é capaz de melhorar a sintomatologia e negatizar a parasitemia e sorologia. No entanto, na fase crônica da doença o tratamento com Nifurtimox pode não ser benéfico para os pacientes (Prata et al., 1975). Os efeitos colaterais observados com maior frequência estão relacionados a sintomas gastrointestinais, como: anorexia, náuseas, vômitos, desconforto abdominal e diarreia; afetando cerca de 50% dos pacientes tratados com Nifurtimox (Bern, 2011; revisto por Rassi Jr et al., 2012). Outros efeitos colaterais observados frequentemente envolve toxicidade neurológica, incluindo: insônia, irritabilidade, desorientação, mudanças de humor, parestesias, cefaleia e tremores (Bern, 2011). Ainda podem ser observada astenia, dormência nas extremidades do corpo, e menos frequentemente, efeitos colaterais como: polineuropatia sensitiva periférica, dor precordial, edema alérgico, tontura e mal-estar. Além disso, alguns pacientes podem ainda apresentar baixa tolerância ao medicamento, sendo necessária a interrupção do tratamento (Prata et al, 1975).

Atualmente Benznidazol é medicamento de primeira linha para o tratamento da doença de Chagas no Brasil, tendo em vista que Nifurtimox teve sua comercialização suspensa desde os anos 80 (revisto por Coura e de Castro, 2002). Apesar disto, o Nifurtimox continua sendo uma alternativa para casos de intolerância ao Benznidazol, sendo utilizado como uma terapia de segunda linha no Brasil (Ministério da Saúde do Brasil, 2008). Benznidazol pode ser administrado em doses mais baixas, além de apresentar maior eficácia na cura e efeitos colaterais menos intensos quando comparado ao nifurtimox, tornando-se então a primeira opção no tratamento para a doença de Chagas. O tratamento com Benznidazol pode causar efeitos colaterais como: (i) dermatite de hipersensibilidade, sendo o mais frequente, caracterizada por erupções cutâneas, edema generalizado, febre, linfadenopatias e dor muscular e articular; (ii) polineurite e neuropatia periférica, efeito tóxico grave relacionada a alta dose durante o tratamento e (iii) depressão da medula óssea, neutropenia, agranulocitose e púrpura trombocitopênica (Coura et



al., 1997; Cançado, 2002).

Recentemente, o estudo clínico randomizado BENEFIT, o maior estudo clínico já realizado em pacientes portadores da doença de Chagas, avaliou o efeito do Benznidazol na fase crônica da doença. O estudo concluiu que apesar de alcançar uma redução na detecção de parasitas no sangue de pacientes cronicamente infectados, o tratamento com Benznidazol não foi capaz de impedir ou reverter agravamentos no quadro cardíaco, como taquicardia e inserção de marcapasso, em pacientes com danos cardíacos já estabelecidos (Morillo et al., 2015). Embora o efeito benéfico do tratamento de pacientes portadores da CCC com Benznidazol não tenha sido confirmada, é consenso que a persistência do parasita no tecido cardíaco é crucial para o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia chagásica (Rassi Jr et al., 2017). Assim, apesar de não haver uma redução estatisticamente significativa nas taxas de mortalidade e morbidade no grupo tratado com Benznidazol, houve redução significativa no número de pacientes internados por sintomas cardiovasculares (Morillo et al., 2015). Além disso, analisando-se os dados do estudo BENEFIT separando as regiões geográficas, os pacientes do Brasil responderam de forma positiva ao tratamento com Benznidazol (Rassi Jr et al.; 2017). Dessa forma, o estudo BENEFIT apresenta importantes limitações em seu desenho experimental, e consequentemente conclusões questionáveis, que necessitam ser melhor explorados, como o fato da detecção de parasitas circulantes baseada em PCR, levando à associação equivocada de que a presença do parasita não tem relação com progressão da doença, negando o consenso atual, entretanto, não se tem informações sobre a persistência do parasita no tecido cardíaco após o tratamento. Portanto, os resultados do estudo BENEFIT merecem ser mais explorados antes de concluir que terapias tripanosomicidas, especialmente o benznidazol não tem papel no tratamento de pacientes com CCC estabelecida (Rassi Jr et al., 2017).

Ambos os medicamentos, Nifurtimox e Benznidazol, apresentam baixa eficácia na fase crônica tardia da doença de Chagas e, além disso, são necessários 60 dias de tratamento com 2-3 doses diárias, o que pode ser uma das causas de abandono do tratamento. Outra desvantagem se refere à contraindicação para pacientes grávidas, pacientes com insuficiência renal ou hepática e pacientes muito debilitados ou com idade muito avançada (revisto por Coura e de Castro, 2002; revisto por Coura e Dias, 2009). Durante a fase crônica da doença, quando já são

observadas manifestações cardíacas ou digestivas, não existem terapias específicas para o tratamento da doença de Chagas, sendo realizado um tratamento sintoma-específico, que varia de acordo com os sintomas desenvolvidos pelo paciente, semelhante aos tratamentos para cardiomiopatias em geral (Muñoz-Saravia et al., 2012). Tendo em vista o longo período de tratamento com esses compostos, suas contraindicações e efeitos colaterais, que podem impedir a conclusão do tratamento, são de significativa importância o desenvolvimento de novos compostos, menos tóxicos e eficazes nas diferentes fases da doença de Chagas.

## **1. 2. Fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ )**

### **1.2.1. Superfamília TGF- $\beta$**

O fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ), descoberto em 1982, foi descrito pela primeira vez como uma fração adicional ao TGF- $\alpha$  capaz de conferir "transformação" de colônias de fibroblastos renais de rato (Roberts et al., 1982). Em mamíferos existem três isoformas de TGF- $\beta$ : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Estas isoformas compartilham homologia de cerca de 70% na sequência de aminoácidos, entretanto, são codificados por genes distintos, localizados em regiões distintas do cromossomo humano (Kimura et al., 2007). As três isoformas de TGF- $\beta$  integram o conjunto da Superfamília TGF- $\beta$  (Figura 1.5), juntamente com outras diversas proteínas que se assemelham estruturalmente, apresentando 7 resíduos de cisteínas. São elas: activinas, proteínas morfogênicas do osso (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais (GDNF), substância inibidora Mülleriana (MIS) e inibinas (Massagué, 1998). As activinas são os membros desta superfamília que apresentam características mais semelhantes ao TGF- $\beta$  (Kimura et al., 2007).

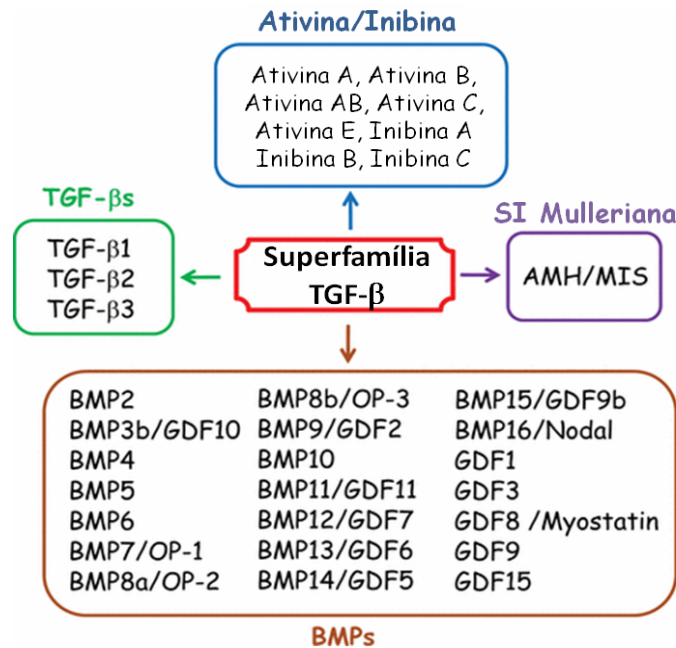


Figura 1.5: Representação esquemática dos membros da Superfamília TGF-β em mamíferos. Fonte: adaptado de Santibañez et al., 2011.

### 1.2.2. Funções, estrutura e ativação

O TGF-β é uma citocina multifuncional, que desempenha importante papel na regulação de processos como apoptose celular, embriogênese, migração de células epiteliais e transições endotelial-mesenquimal (Moustakas e Heldin, 2005). No entanto, suas principais atividades biológicas estão associadas à regulação da proliferação e diferenciação celular, atividades imunossupressoras e regulação da deposição de componentes de matriz extracelular (Reisdorf et al., 2001; Moustakas e Heldin, 2005).

Diversos tipos celulares como fibroblastos, plaquetas, células da placenta, células do sistema imune e ainda células malignas são capazes de sintetizar e secretar TGF-β (Roberts et al., 1982; Massagué, 1983; Frolík et al., 1983; Kehrl et al., 1986). Todas essas células secretam TGF-β latente (LTGF-β), que é biologicamente inativo. Haja visto os diversos efeitos biológicos do TGF-β, o controle da sua atividade é uma etapa crítica para a manutenção de funções fisiológicas normais, sua desregulação implica na patogênese de numerosas doenças (Khalil, 1999).

O LTGF- $\beta$  é formado por dímeros contendo uma região N-terminal, que confere a latência, denominada peptídeo associado à latência (LAP) e uma região C-terminal, potencialmente ativa. As regiões N-terminal e C-terminal estão associadas não covalentemente e formam o pequeno complexo latente (Figura 1.6). LAP se liga também a uma proteína adicional, denominada proteína de ligação à TGF- $\beta$  latente (LTBP), formando assim o grande complexo latente (Figura 1.6) (Saharinen et al., 1999). LTBP se liga a LAP por pontes de hidrogênio, essa associação não confere latência à TGF- $\beta$ , no entanto, está relacionada ao controle da secreção e armazenamento na matriz extracelular (Massagué, 1998).

Para que o TGF- $\beta$  seja ativo é necessária sua separação do complexo latente, essa proteólise resulta em dois produtos: o dímero de 65-75 kDa a partir da porção N-terminal referente a LAP e o dímero de 25 kDa a partir da região C-terminal, que é a forma biologicamente ativa de TGF- $\beta$ . Dessa forma, TGF- $\beta$  ativo pode interagir com seus receptores de superfície celular e desempenhar suas funções biológicas. Assim a regulação da conversão de LTGF- $\beta$  para TGF- $\beta$  ativo é um dos meios mais importantes para controlar a atividade do TGF- $\beta$  (Khalil, 1999). A ativação do TGF- $\beta$  *in vitro* pode ocorrer por vários mecanismos, como: ativação físico-química (extremos de pH e temperatura elevada), ativação enzimática e ativação induzida por hormônio. A existência de diferentes isoformas de TGF- $\beta$  e complexos latentes, como o número de diferentes LTBPs, indicam que existem várias vias para ativação do TGF- $\beta$  (Koli et al., 2001).

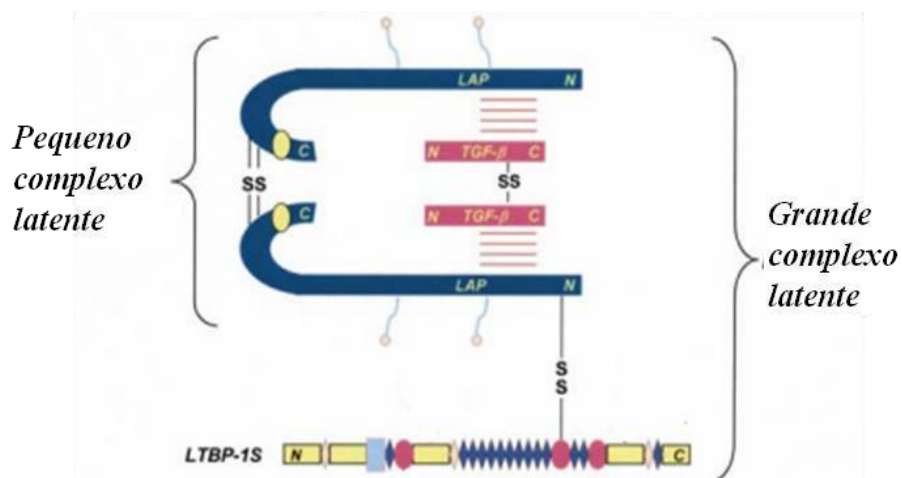


Figura 1.6: Complexo TGF- $\beta$  latente. Fonte: adaptado de Brunner e Blakytyn, 2004.

### 1.2.3. Vias de sinalização

Uma vez ativo, o TGF- $\beta$  é então reconhecido por seus receptores, desencadeando assim sua via de sinalização. A sinalização de TGF- $\beta$  inicia-se a partir da sua interação com seus três receptores de superfície: receptor de TGF- $\beta$  do tipo I (T $\beta$ RI), do tipo II (T $\beta$ RII) e do tipo III (T $\beta$ RIII), presentes em todos os tipos celulares estudados (Massagué, 1998; Pieck et al., 1999). Os receptores de TGF- $\beta$  do tipo I e do tipo II são receptores serina/treonina quinase transmembranares (revisto por Verrechia e Mauviel, 2007). O receptor de TGF- $\beta$  do tipo III, também denominado betaglicano, atua modulando diretamente a interação entre TGF- $\beta$  e seus receptores de sinalização (T $\beta$ RI e T $\beta$ RII), uma vez que se liga a esses receptores com alta afinidade. Assim, T $\beta$ RIII se liga ao TGF- $\beta$  e o apresenta a T $\beta$ RII (Lopez-Casillas et al., 1993). A ligação de TGF- $\beta$  a T $\beta$ RII induz a formação de um complexo formado por T $\beta$ RI e T $\beta$ RII, no qual T $\beta$ RII fosforila o domínio serina/treonina do T $\beta$ RI resultando na sua ativação (revisto por Verrechia e Mauviel, 2007).

A via clássica de sinalização de TGF- $\beta$ , esquematizada na figura 1.7, envolve o grupo de proteínas Smads. T $\beta$ RI ativado fosforila as Smads 2 e 3, e uma vez ativas se ligam à Smad 4 formando um complexo heteromérico que se transloca para o núcleo, onde em associação com outros fatores de transcrição regulam a transcrição de genes responsivos ao TGF- $\beta$  (Pieck et al., 1999). Há ainda as vias alternativas de sua sinalização, quando seus receptores agem sobre substratos diferentes das Smads. As mais descritas são as proteínas quinase N-terminal c-jun (JNK) e as proteínas quinase ativada por mitógeno (P38 e ERK) (revisto por Massagué et. al., 2000; Moustakas e Heldin, 2005).

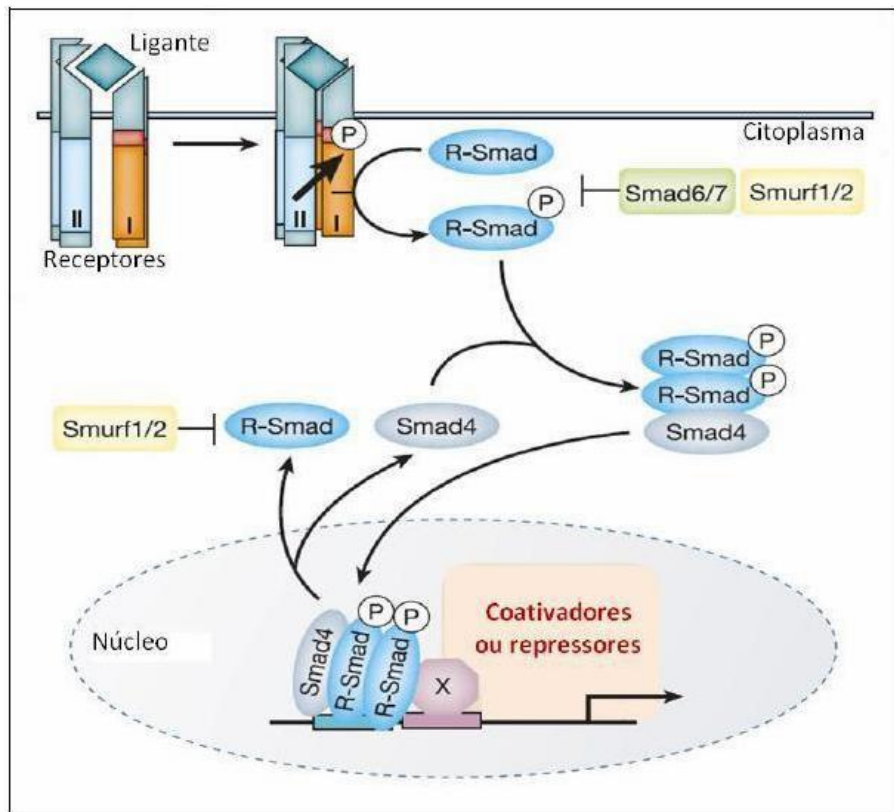


Figura 1.7: Via de sinalização clássica do TGF- $\beta$ . Representando os receptores de TGF- $\beta$  e ativação da via smad. Fonte: adaptado de Derynck e Zhang, 2003.

#### 1.2.4. TGF- $\beta$ e fibrose

O TGF- $\beta$  se destaca como um regulador chave na produção e remodelamento da matriz extracelular (MEC), uma vez que têm a capacidade de induzir a expressão de proteínas da MEC e ainda estimular a produção de inibidores de protease (Verrecchia e Mauviel, 2007). O mecanismo pelo qual exerce a função de impedir a degradação da MEC envolve a inibição da atividade de MMPs através da indução de síntese de inibidores de protease, tais como o Inibidores de Tecido de Metaloproteinases (TIMPs) e o Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1 (PAI-1) (Schiller et al., 2004). Dessa forma, uma elevada expressão de TGF- $\beta$  e subsequentemente a desregulação de suas funções, correlaciona-se diretamente com o surgimento de doenças fibróticas, provocada pela deposição anormal de tecido conjuntivo no órgão afetado (Verrecchia e Mauviel, 2007).

A desregulação no processo de cicatrização e reparação tecidual resulta em uma exacerbada deposição de componentes da MEC e consequente desenvolvimento da fibrose. Entre os eventos característicos no desenvolvimento da fibrose está a produção, secreção e ativação do TGF- $\beta$  (Kisseleva e Brenner, 2008), que estimula a principal fonte de MEC, o fibroblasto, a produzir proteínas tais como: fibronectina, colágeno tipo I e tipo III, elastina e glicosaminoglicanas (Verrecchia e Mauviel, 2007). Além disso, TGF- $\beta$  atua também estimulando a diferenciação de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos, forma com propriedades contráteis de células musculares lisas que secretam ativamente proteínas fibrogênicas, contribuindo para alteração das propriedades e funções do tecido afetado (Masseno et al., 2010).

#### 1.2.5. TGF- $\beta$ na doença de Chagas

Diversos estudos têm relatado o envolvimento de TGF- $\beta$  na fibrose cardíaca (Eghbali et. al., 1991; Okada et. al., 2005; Tan et al., 2010) e em outros órgãos como rim, fígado e pulmão (Wang et al., 2005; Petersen et al., 2008; Gellibert et al., 2006; Daniels et al., 2004). Na doença de Chagas, o envolvimento do TGF- $\beta$  foi descrito pela primeira vez em 1991. Nesse estudo foi observado que TGF- $\beta$  inibe a atividade de INF- $\gamma$  favorecendo a sobrevivência do parasita e consequentemente o aumento da parasitemia, uma vez que INF- $\gamma$  tem efeito tripanossomicida, interferindo assim no controle natural na infecção pelo *T. cruzi* (Silva et al., 1991).

Posteriormente, em 1995, foi demonstrado que TGF- $\beta$  atua favorecendo a infecção de *T. cruzi* na célula hospedeira, através de ensaios *in vitro*. Utilizando células epiteliais mutadas, deficientes para T $\beta$ RI ou T $\beta$ RII, foi observado que apesar de *T. cruzi* ser capaz de aderir, não foi capaz de invadir e se replicar no interior das células mutadas. Quando foi feita a transfecção dos genes dos receptores T $\beta$ RI ou T $\beta$ RII, *T. cruzi* recupera a capacidade de invadir essas células, demonstrando o envolvimento da sinalização de TGF- $\beta$  na infecção de células hospedeiras (Ming et. al., 1995). Sabe-se que a localização subcelular de T $\beta$ RII está associada a proteínas do citoesqueleto e essa localização contribui para a ativação da via de sinalização de TGF- $\beta$  (Moustakas e Heldin, 2008).

Recentemente foi demonstrado que a associação de T $\beta$ RII ao citoesqueleto está ligada à constâmeres de vinculina e a ativação da via de sinalização de TGF- $\beta$  é dependente da manutenção da integridade do citoesqueleto. Além disso, em modelo de infecção *in vitro*, foi demonstrado também que *T. cruzi* induz a desorganização do citoesqueleto, gerando uma redução da distribuição dos receptores de tipo II de TGF- $\beta$  em cardiomiócitos altamente infectados, o que pode levar a uma resposta reduzida a TGF- $\beta$  nessas células (Calvet et al., 2016).

Tem sido amplamente descrito o envolvimento direto do TGF- $\beta$  em processos chaves no desenvolvimento da patologia, tais como: (i) regulação da inflamação e da resposta imune; (ii) infecção do parasita na célula hospedeira; (iii) ciclo intracelular do parasita; (iv) fibrose e (v) remodelamento cardíaco, durante a fase aguda e crônica da doença de Chagas (Araújo-Jorge et al., 2008; 2012).

Waghbi e colaboradores (2005a) demonstraram que *T. cruzi* ativa diretamente TGF- $\beta$  latente, como uma estratégia necessária para a invasão da célula hospedeira representando um papel importante na modulação da infecção por *T. cruzi*. Recentemente, foi demonstrado que esta ativação é realizada por uma cisteíno peptidase expressa por *T. cruzi*, denominada cruzipaína, a principal e mais expressa cisteíno peptidase em *T. cruzi* (Ferrão et al., 2015).

A participação do TGF- $\beta$  no ciclo intracelular do parasita também foi relatado por Waghbi e cols., (2005b), através de ensaios *in vitro* com cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi*. Observou-se que as formas amastigotas são capazes de internalizar TGF- $\beta$  em sua bolsa flagelar e vesículas intracelulares. Entretanto, esse estoque diminui durante a diferenciação de amastigotas para as formas tripomastigotas, sugerindo um papel regulador da citocina durante o ciclo intracelular do *T. cruzi*.

Em alguns estudos foram avaliadas a produção de TGF- $\beta$  na doença de Chagas. Samudio e cols., (1999) relataram que primatas infectados por *T. cruzi* apresentam aumento na produção de TGF- $\beta$  já na primeira semana da fase aguda e segue constantemente expresso ao longo da fase crônica da infecção. Outro importante estudo com pacientes crônicos portadores da doença de Chagas, demonstrou-se que esses pacientes apresentam níveis mais elevados de TGF- $\beta$  circulante (10-20 vezes) quando comparados à indivíduos saudáveis (Araújo-Jorge



et al., 2002).

Araújo-Jorge e colaboradores (2002) relatam ainda o envolvimento da sinalização de TGF- $\beta$  no desenvolvimento da fibrose cardíaca, demonstrando que células cardíacas de pacientes com disfunção cardíaca moderada ou grave apresentaram forte imunorreatividade para Smad-2 fosforilada, um marcador da ativação da via de sinalização clássica de TGF- $\beta$ , associado a um aumento na deposição de fibronectina. Outro estudo utilizando modelo murino demonstrou que camundongos *knockout* para  $\alpha$ 2-macroglobulina, um inibidor de protease que se liga a TGF- $\beta$  e mantém TGF- $\beta$  na sua forma latente, apresentaram carga parasitária significativamente elevada e aumento nos níveis de TGF- $\beta$  circulante associado a grandes áreas de fibrose no tecido cardíaco (Waghabi et al., 2002).

Recentemente, foi demonstrado que durante a fase aguda da doença de Chagas experimental, os níveis de TGF- $\beta$  estão mais elevados e sua via de sinalização está mais ativa, uma vez que foi observado: aumento na expressão dos receptores T $\beta$ RI e T $\beta$ RII e aumento na fosforilação das proteínas da via de sinalização clássica (Smad2/3) e alternativa (JNK, p38, ERK). Esse aumento observado pode estar associado ao processo de deposição de matriz extracelular, uma vez que foi relatado também aumento na expressão de proteínas responsivas a TGF- $\beta$ , como fibronectina e CTGF, e aumento na deposição de colágeno tipo I no coração dos animais infectados pelo *T. Cruzi*. Esses dados indicam que a regulação positiva da sinalização de TGF- $\beta$  pode estar diretamente ligada à formação de fibrose cardíaca na doença de Chagas (Ferreira et al., 2016).

A Conexina-43 (Cx-43), uma proteína de junção do tipo Gap, é uma importante molécula responsável pela condução do impulso elétrico no coração, e que também é afetada pelo TGF- $\beta$  na doença de Chagas. Waghabi e cols. (2009a) demonstraram que elevados níveis de TGF- $\beta$  em pacientes portadores da doença de Chagas crônicos estão associados a uma redução significativa no número de placas de Cx43, além de uma desorganização dessas estruturas de placas. Essas alterações contribuem para a condução anormal do impulso elétrico e arritmias, sintomas característicos da cardiomiopatia grave na doença de Chagas.

### 1.2.6. Compostos anti-TGF- $\beta$ na doença de Chagas

Tomados em conjunto, os dados demonstram o papel central do TGF- $\beta$  no processo de remodelamento da MEC e formação de fibrose, o que o torna um importante alvo terapêutico. Dessa forma, o desenvolvimento de compostos que inibem a sinalização e atividade de TGF- $\beta$  (Figura 1.8) são de grande interesse na busca pela recuperação do órgão acometido. O bloqueio na sinalização de TGF- $\beta$  pode então representar uma promissora terapia para diversas patologias associadas à fibrose. Neste sentido, o grupo vem estudando intensamente a ação terapêutica de compostos farmacológicos inibidores da atividade de TGF- $\beta$  na doença de Chagas.

Inicialmente foi testado o efeito do composto SB-431542, um inibidor do receptor de TGF- $\beta$  tipo I (T $\beta$ RI), em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*. O tratamento com SB-431542 foi capaz de inibir a ativação da via de TGF- $\beta$  induzida pelo parasita, reduzindo assim a invasão de *T. cruzi* nos cardiomiócitos, afetando também seu ciclo intracelular, uma vez que inibiu a diferenciação do parasita da forma amastigota para tripomastigotas. Além disso, o tratamento também induziu a apoptose de parasitas intracelulares (Waghabi et al., 2007). Em outro estudo do grupo foi avaliado o efeito do SB-431542 sobre as proteínas de junções do tipo Gap conexina-43 (Cx43). Foi observado que cardiomiócitos tratados com TGF- $\beta$  ou infectados por *T. cruzi* apresentaram uma desorganização e significativa redução na expressão de Cx-43. Essas alterações contribuem para a condução anormal do impulso elétrico, que foi revertido após o tratamento com SB-431542, aumentando a expressão de Cx43 e restabelecendo a organização da sua estrutura de placas nos cardiomiócitos (Waghabi et al., 2009a).

Em estudos utilizando o modelo murino de fase aguda foi avaliada a ação terapêutica do SB-431542. Nesse trabalho, foi observado que o tratamento de camundongos com o SB-431542, reduziu a mortalidade e a parasitemia, reduzindo também o número de infiltrados inflamatórios e a carga parasitária no miocárdio. Além de evitar danos cardíacos e prevenir alterações na condução elétrica cardíaca dos animais (Waghabi et al., 2009b).

Também foi avaliado pelo grupo a atividade terapêutica de um outro inibidor da via de sinalização de TGF- $\beta$ , o GW788388. Este composto tem como grande diferencial o fato de ser administrado por via oral, associado a uma maior seletividade, especificidade e potência de ligação ao receptor de TGF- $\beta$  (Gellibert et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que GW-788388 atua como inibidor da fosforilação tanto do T $\beta$ RI como do T $\beta$ RII (Petersen et al., 2008). No estudo realizado pelo grupo, foi avaliado o efeito do tratamento com o GW-788388 durante a fase aguda experimental da infecção pelo *T. cruzi*. Foi observado que o tratamento reduziu a mortalidade, parasitemia e disfunção elétrica, preservou a organização das placas de Cx43 e impediu o desenvolvimento da fibrose cardíaca em camundongos infectados por *T. cruzi*. Além disso, o tratamento com o composto GW788388 no final da fase aguda foi capaz de reduzir a mortalidade e reverter fibrose cardíaca nos animais infectados (de Oliveira et al., 2012).

Recentemente nosso grupo investigou ainda o efeito do tratamento com GW788388, em modelo experimental de doença de Chagas crônica. Neste estudo paralelo ao presente trabalho, foi observado que o tratamento com GW788388, em dois esquemas de tratamento, uma vez e três vezes por semana, durante a fase crônica experimental da doença de Chagas, teve efeito terapêutico benéfico, uma vez que foram observados a diminuição dos níveis circulantes de TGF- $\beta$ , a melhora de parâmetros eletrocardiográficos e a redução da expressão e deposição de colágeno tipo I e fibronectina no tecido cardíaco. Assim, o tratamento com GW788388 na fase crônica também foi capaz de recuperar a condução elétrica cardíaca e reverter fibrose no coração de camundongos com CCC (Dados em submissão).

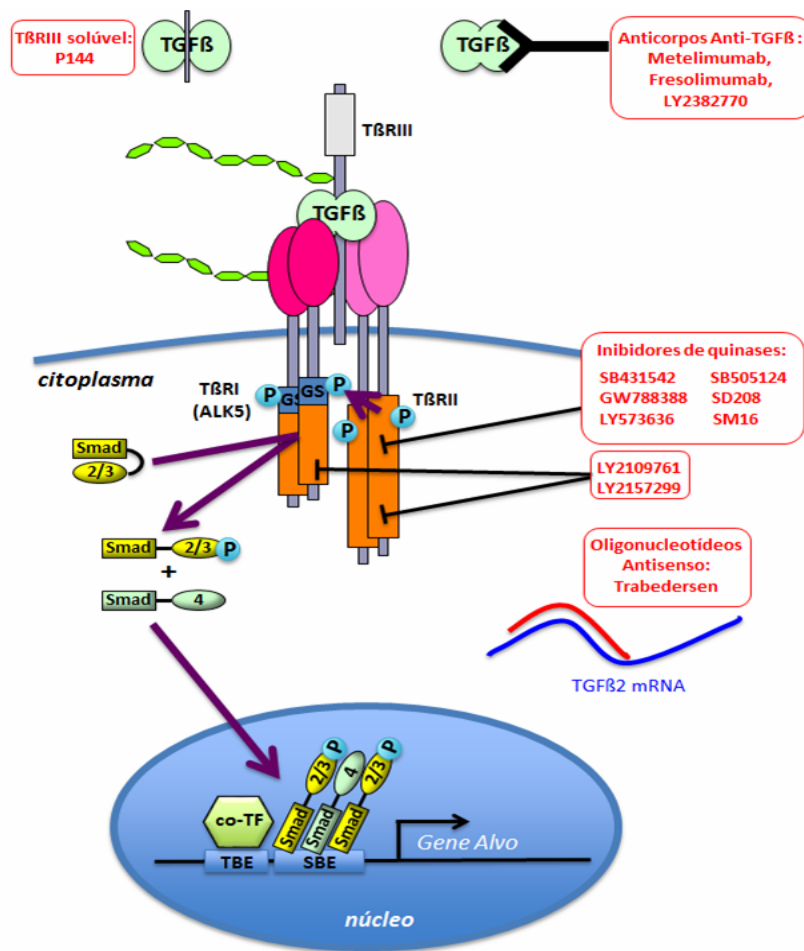


Figura 1.8: Inibidores farmacológicos da via de sinalização de TGF-β. Fonte: adaptado de Araujo- Jorge et al., 2012.

### 1. 3. Regulação da matriz extracelular: MMPs e TIMPs

A matriz extracelular é um complexo de proteínas fibrilares, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, sendo composta principalmente por uma rede de colágenos, elastina, fibronectina e laminina. A função biológica da MEC é o suporte estrutural, sendo capaz de manter a arquitetura do tecido, preenchendo os espaços entre as células. Além disso, também confere adesão e forma, permitindo a migração, a proliferação e a diferenciação das células adjacentes (revisto por Medeiros et al., 2012). A regulação dos componentes de matriz extracelular envolve um mecanismo de controle entre os níveis e atividade de metaloproteases de matriz (MMPs) e dos

seus inibidores teciduais (TIMPs) (Zhang et al., 2014).

As MMPs pertencem a uma família multigênica de endopeptidases dependentes de zinco e cálcio, denominada Metzincin. Essa família é codificada por 24 genes distintos em humanos, que são expressos como 26 diferentes endopeptidases, compartilham a mesma topologia estrutural, apresentando pró-domínio e um domínio catalítico. O pró-domínio, localizado após o pré-domínio, mantém a enzima em sua forma inativa. O domínio catalítico é onde se localiza o íon zinco ligado ao sítio ativo. O sítio ativo é o local em que os substratos se ligam especificamente à proteína (Parks et al., 2004; Mannello & Medda, 2012). Sabe-se que as MMPs são classificadas de acordo com sua estrutura primária e especificidade de substrato, nos seguintes grupos: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMPs de membrana (MT-MMP) e outras MMPs.

As células secretam MMPs numa forma inativa, como pró-enzimas (pró-MMP) ou zimogênios, sendo necessária ativação proteolítica através da remoção do pró-peptídeo, expondo assim o sítio de ligação ao substrato (Geurts et al., 2011). A ativação das MMPs ocorre através da ação de proteinases como a plasmina e outras MMPs, que são capazes de clivar o pró-peptídeo de suas estruturas (revisado por Amălinei et al., 2007).

Dentre as diferentes MMPs, a MMP-2 e a MMP-9, esquematizadas na figura 1.9, destacam-se por seu envolvimento em doenças cardíacas, uma vez que evidências demonstram que estão presentes no miocárdio e são capazes de degradar todos componentes da matriz do coração (Polyakova et al., 2010). Além disso, é descrito que MMP-2 e MMP-9 são capazes de ativar TGF- $\beta$  (Igotz e Massagué, 1986; Yu e Stamenkovic, 2000). As MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) formam o grupo das gelatinases, que são as mais distribuídas, podendo ser produzidas por fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, monócitos, macrófagos, osteoblastos e condrócitos (revisado por Amălinei et al., 2007). Essas moléculas além de degradar gelatina, são capazes de degradar também colágenos tipo I, tipo IV, tipo V e tipo X, elastina, laminina e fibronectina (Stamenkovic, 2000).

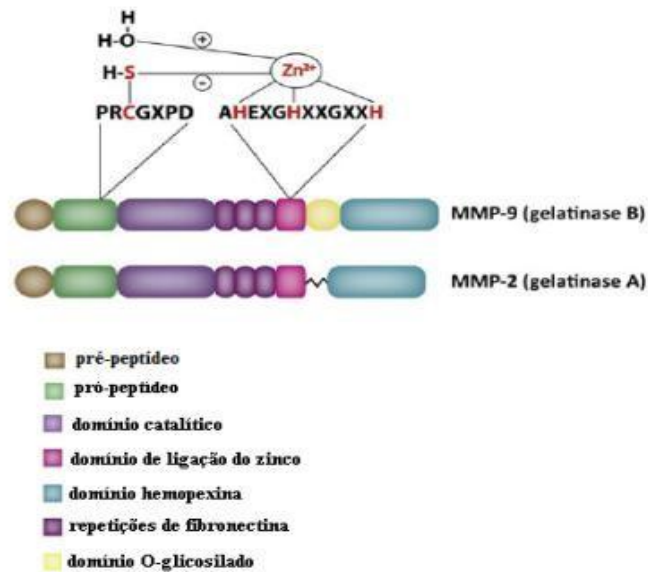


Figura 1.9: Estrutura das metaloproteases 9 e 2. Representação esquemática da organização de domínios das MMPs 2 e 9. As gelatinases são distinguidas por um domínio adicional de ligação à gelatina com três repetições de tipo fibronectina. Além disso, MMP-9 é a única MMP que contém um domínio O-glicosilado. Fonte: adaptado de Geurts et al., 2012.

A atividade das MMPs é rigorosamente controlada desde os níveis de transcrição, secreção e ativação até a inibição pós ativação, assim tanto a pró-enzima quanto a enzima ativada podem ser reguladas endogenamente através de inibidores específicos, denominados Inibidores de Tecido de Metaloproteinases (TIMPs) (Amălinei et al., 2007). Os TIMPs são pequenas proteínas (21-28kDa) que se ligam às MMPs formando um complexo numa estequiometria 1:1, ao se ligarem às MMPs, os TIMPs bloqueiam o sítio ativo, impedindo o acesso ao substrato específico (Souza e Line, 2002; Spinale et al., 2000).

Nos humanos são encontrados quatro tipos de TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), codificados por quatro genes distintos. Em geral, todos os TIMPs são capazes de inibir os mais de 20 tipos diferentes de MMPs, embora apresentem diferentes graus de especificidade entre eles (Brew & Nagase, 2010). Assim, o balanço entre a produção de MMPs e TIMPs representa um ponto crítico para manter o equilíbrio da matriz extracelular, tendo em vista que a desregulação destas moléculas pode desencadear quadros patológicos.

A atividade das metaloproteases pode ainda ser regulada em um segundo

nível, mediado pelo Inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-I) (Franco, 2001), uma vez que as MMPs podem ser ativadas *in vivo* por plasmina (revisto por Amălinei et al., 2007). A plasmina é ativada através da ação da uroquinase ativador de plasminogênio (u-PA), que atua convertendo a pró-enzima, plasminogênio, na enzima ativa, plasmina (Lijnen, 2002), como mecanismo de controle PAI-I atua inibindo a conversão do plasminogênio em plasmina, consequentemente inibindo também a ativação das MMPs mediada por plasmina (Franco, 2001). A regulação da atividade das MMPs pode ainda ser realizada por outros inibidores endógenos, sendo uma das principais a  $\alpha$ 2-macroglobulina, que se liga à MMPs e formam um complexo associado de forma irreversível (Baker et al, 2002).

#### **1. 4. Regeneração cardíaca**

O conhecimento da existência de células tronco residentes no coração resultou em grandes esforços no desenvolvimento por terapias baseadas nestas células, buscando promover o reparo e regeneração do miocárdio danificado (Zamilpa et al., 2014). E apesar de ser conhecido que o coração adulto possui um compartimento de células-tronco residentes, e ainda atribuído que estas células poderiam conferir potencial regenerativo ao coração (Leri et al., 2005). Sabe-se atualmente que as células-tronco residentes no coração contribuem muito pouco para o repovoamento do tecido cardíaco após lesão cardíaca, sendo consenso que são as células progenitoras extracardíacas, derivadas da medula óssea, que contribuem mais efetivamente para a diferenciação de cardiomiócitos no miocárdio ferido (Eschenhagen et al., 2017). Uma vez que as células progenitoras derivadas da medula óssea, sendo a maioria de origem hematopoiética, migram para o coração lesado em taxas mais altas, e diferenciam-se em cardiomiócitos principalmente através do mecanismo de fusão celular (Eschenhagen et al., 2017).

As células tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas, auto renováveis, e que servem como material celular de partida para os tecidos especializados do corpo (Zhang et al., 2006). Diversos tipos de células tronco têm a capacidade de se diferenciar em cardiomiócitos funcionais, indicando que CT podem substituir de forma eficiente células necróticas ou apoptóticas após dano cardíaco (Zamilpa et al., 2014). As células tronco pluripotentes induzidas ou

embrionárias, são as mais promissoras para a realização de regeneração cardíaca através da substituição de cardiomiócitos, pois podem se auto-renovar e diferenciar-se em todos os tipos de células, incluindo cardiomiócitos. Além disso, essa propriedade de diferenciação em múltiplas linhagens, das células tronco embrionárias, proporciona também a diferenciação destas células em células musculares lisas e células endoteliais, permitindo assim repovoar todos os elementos do tecido do miocárdio (Pawani e Bhartiya, 2013). No entanto, a regeneração de lesões amplas são limitadas quando não há um estímulo para a diferenciação das CT (Bailey et al., 2009; Hatzistergos et al., 2010), contudo, algumas moléculas como VEGF e SDF-1 $\alpha$  tem sido utilizadas como forma de estimular a diferenciação destas células em cardiomiócitos (Tang et al., 2009; Wang et al., 2012).

No coração, as CT estão localizadas em microambientes específicos denominados nichos (Gattazzo et al., 2014), conectados por junções aderentes a fibroblastos e miócitos (Ferreira-Martins et al., 2012), e no coração adulto estão alocados preferencialmente no átrio e ápice ventricular (Leong et al., 2017). Há ainda no coração células tronco extra cardíacas, como as células tronco hematopoiéticas provenientes da medula óssea, baço ou circulação sanguínea, que por meio de estímulos migram para o coração, podendo exercer efeitos estimulatórios sobre as células tronco cardíacas residentes (Chan et al., 2009). Já foi demonstrado em modelos de transplante cardíaco, que células extra cardíacas que migram para o coração perdem a expressão de marcadores hematopoiéticos como CD45 e CD34 e passam a expressar fatores de transcrição específicos de células cardíacas como GATA-4 e NKx2.5, e conseqüentemente, adquirindo o fenótipo de célula cardíaca (Li et al., 2007).

Fatores de transcrição cardio-específicos são comumente utilizados como marcadores para a avaliação da diferenciação de cardiomiócitos. Dentre estes fatores de transcrição, GATA-4, GATA-6, NKX2-5 e T-Box5, são os principais marcadores de diferenciação de linhagem cardíaca precoce (revisado por Zamilpa et al., 2014), uma vez que os primeiros e principais fatores de transcrição expressos durante o desenvolvimento de cardiomiócitos são o GATA-4 e o NKX2-5, seguidos de membros da família T-Box (Tbx 2, 5 e 20); estes regulam a expressão de proteínas estruturais ou regulatórias, características de cardiomiócitos (Van Wijk et al., 2007). A família GATA compreende alguns dos principais fatores de transcrição



envolvidos na cardiomiogênese, sendo composta por seis proteínas: GATA-1, GATA-2, GATA-3, GATA-4, GATA-5 e GATA-6; sendo as três últimas associadas a tecidos da endoderme e mesoderme (Pikkarainen et al., 2004). O NKX2-5 é outro fator de transcrição importante para a cardiomiogênese, sendo fundamental para maturação funcional dos cardiomiócitos ventriculares e para a manutenção da homeostase dos cardiomiócitos (Akazawa e Komuro, 2005; revisto por Shiojima e Komuro, 2005). O fator de transcrição Tbx5 desempenha papel fundamental na iniciação e manutenção da programação genética do miocárdio, sendo expresso na mesoderme cardíaca durante os estágios iniciais da cardiomiogênese (revisto por Shiojima e Komuro, 2005).

Além dos marcadores de linhagem cardíaca precoce, há ainda marcadores para avaliação da geração de cardiomiócitos a partir de células específicas, como as células tronco mesenquimais (MSC). As MSCs provenientes da medula óssea, podem migrar para o coração e desempenhar papéis importantes no reparo e regeneração cardíaca, assim a expressão de proteínas como titina cardíaca, troponina T, desmina, MHC, MEF2 e fosfolaban, tem sido utilizada como marcadores para a diferenciação de cardiomiócitos a partir de MSCs (revisto por Zamilpa et al., 2014).

## **1.5. Justificativa**

O papel do TGF- $\beta$  como indutor de diversos processos patológicos na doença de Chagas, o torna um relevante alvo para o desenvolvimento de terapias de pacientes cardiopatas crônicos. A compreensão dos mecanismos disparados pelo composto inibidor da atividade de TGF- $\beta$  e a interferência destes fatores no desenvolvimento da cardiopatia chagásica, são de grande importância. Assim, com o presente estudo esperamos contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patologia da CCC com enfoque na atividade do TGF- $\beta$  e na recuperação cardíaca intermediada por GW788388. Essas informações podem contribuir para compor uma nova proposta de terapia, que possam ser aditivas à terapia tripanocida, buscando melhorar a qualidade de vida de pacientes acometidos pela CCC.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Compreender os mecanismos de reversão de fibrose e remodelamento cardíaco observado após o tratamento com o composto GW788388, inibidor da atividade de TGF- $\beta$ , durante a fase crônica cardíaca da doença de Chagas em modelo experimental murino.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1) Avaliar o perfil de expressão de conexina-43 no coração dos animais infectados submetidos ou não ao tratamento com GW788388;
- 2) Analisar a expressão e atividade de MMP-2 e MMP-9 no coração de animais infectados tratados ou não com GW788388;
- 3) Avaliar os níveis de TIMP-1 circulantes, e expressão de TIMP-1, -2, e -4 no coração dos animais infectados tratados ou não com GW788388;
- 4) Analisar a expressão gênica e proteica de marcadores de regeneração cardíaca: GATA-4, GATA-6, NKX2-5, T-box5, titina cardíaca, troponina T e desmina no coração de animais infectados tratados ou não com GW788388.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Composto

O composto utilizado foi o GW788388 4-(4-[3-(Piridin-2-yl)-1H-pirazol-4-yl] piridin-2-yl)-N-(tetrahydro-2Hpyran-4-yl) benzamida, produzido pela GlaxoSmithKline Pharmaceuticals. Este composto atua inibindo a via de sinalização de TGF- $\beta$ , uma vez que é um inibidor competitivo do sítio de ligação de ATP de ambos os receptores tipo I e tipo II de TGF- $\beta$ .

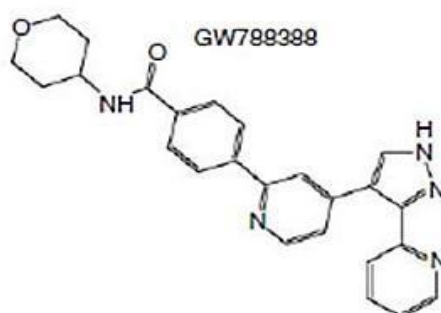


Figura 3.1: Estrutura química do composto GW788388. Fonte: Petersen et al., 2008.

#### 3.2. Modelo experimental

Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ), foram inoculados por via intraperitoneal com 100 ( $10^2$ ) formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa colombiana. O pico da parasitemia ocorreu em 42 dias após a infecção.

Os camundongos foram mantidos em condições estáveis de temperatura e livre de patógenos específicos, com ciclo de luz de 12h claro/escuro e com acesso a água e ração *ad libitum* durante 150 dias no biotério do Pavilhão Cardoso Fontes.

Foram realizados quatro ensaios, todos em conformidade com o comitê de ética e pesquisa da FIOCRUZ - Protocolo CEUA LW42/11 (Anexo I).

### 3.3. Grupos experimentais e tratamento

Os animais foram divididos em grupos de 10 animais, respeitando-se o limite de 5 animais por gaiola, da seguinte forma: Não infectados não tratados, Infectados não tratados e Infectados tratados (dois esquemas de tratamento: 1x por semana ou 3x por semana). Os animais foram então agrupados em 4 grupos diferentes (Tabela 3.1). Após 120 dias de infecção foi iniciado o tratamento dos animais por via oral (gavage) na concentração de 3 mg/kg/camundongo, com duração de 30 dias, em dois esquemas diferentes: (i) 1x por semana ou (ii) 3x por semana. A solução estoque do composto, 20 mg/ml, foi preparada em tampão contendo (4% DMSO, 96% [5% Tween 20, 20% HCl 1M em NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1M]). A cada dia de administração do composto foi preparada a solução trabalho diluída em água filtrada e cada animal recebeu 100µl da solução diluída.

Tabela 3.1- Relação dos grupos experimentais

<b>Grupos experimentais</b>	
NI	animais não infectados
dpi 120	animais infectados com <i>T.cruzi</i> e não tratados
dpi 150	animais infectados com <i>T.cruzi</i> e não tratados
dpi150+GW1x	animais infectados com <i>T.cruzi</i> tratados com GW 1x por semana
dpi150+GW3x	animais infectados com <i>T.cruzi</i> tratados com GW 3x por semana

### 3.4. Obtenção do soro

O sangue foi coletado por punção cardíaca, após eutanásia dos animais, nos dias 120 e 150 pós-infecção. Em seguida, foi realizada a centrifugação do material a 4000 rpm a 4°C, por 10 minutos para a obtenção do soro. O soro obtido foi

armazenado a -70°C até a análise para dosagem dos níveis de TIMP-1 por ELISA.

### **3.5. Dosagem dos níveis séricos de TIMP-1**

A dosagem dos níveis séricos de TIMP-1 foi realizada através da técnica de ELISA, utilizando o kit Quantikine® ELISA Mouse TIMP-1 Immunoassay (R&D Systems). A dosagem foi realizada conforme as recomendações do fabricante. As medidas de absorvância foram obtidas, contra o branco, em um leitor de microplacas da Molecular Devices com filtro de 450nm. As leituras foram obtidas no programa SoftMax Pro Software. Todas as amostras foram testadas em duplicatas e a média das leituras foi considerada para a análise.

### **3.6. Coleta de tecidos**

Os animais foram eutanaziados em câmara de CO<sub>2</sub> e o tecido cardíaco dos animais dos diferentes grupos experimentais foi coletado no 120<sup>o</sup> e 150<sup>o</sup> dpi. Os tecidos foram lavados em PBS e cortados ao meio em sentido transversal, sendo uma metade imediatamente fixada em solução de Millonig-Rosman (10% Formalina em PBS) para análise histológica e a outra metade congelada em nitrogênio líquido e mantida a -70°C para posterior extração de proteínas e RNAm.

### **3.7. Imunohistologia e quantificação de placas de Cx-43**

Com os tecidos emblocados em parafina foram obtidos cortes de 3µm de espessura e aderidos a lâminas revestidas com poli-L-lisina e mantido a 37°C durante 48h. Em seguida foi realizada uma bateria de retirada da parafina em três banhos de xilol e reidratação em concentrações decrescentes de etanol (100%,

90%, 70% e 50%) em lavagens de três minutos cada. Após, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 10mM pH 6, no forno de microondas a 750W por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos ao bloqueio de sítios inespecíficos com 3% BSA (albumina soro bovina) em PBS por 1h. Novo bloqueio com soro normal de cabra (animal em que foi preparado o anticorpo secundário) diluído 1:500 em solução 1% BSA em PBS durante 1h. Em seguida as amostras foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário anti- conexina-43 (diluído 1:800 feito em coelho – Sigma). Em seguida foram lavados com solução 1% BSA em PBS três vezes por 10 minutos e então incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpo secundário (diluído em solução de bloqueio 1:500) anti- coelho Alexa Fluor 488. Em seguida foram realizadas mais três lavagens com solução 1% BSA em PBS por 10 minutos e após foi feita marcação do DNA (núcleo) por incubação com DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindol) diluído em solução de bloqueio 1:1000 por 10 minutos a temperatura ambiente. Após as lâminas foram lavadas com solução 1% BSA em PBS por 10 minutos e os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com 1.4-diazabicyclo-(2.2.2)-octano (DABCO). Os cortes foram observados em microscópio de epifluorescência (Nikon).

Para a quantificação do tamanho das placas de Cx-43 as imagens foram obtidas utilizando o microscópio de epifluorescência (Nikon) e cada área de teste foi fotografada em uma ampliação de impressão final de 400x, nesta ampliação, uma área de teste típica incluiu aproximadamente 34.600  $\mu\text{m}^2$  de área do tecido. Os tamanhos das placas de Cx43 foram avaliados usando o software NIS-Elements D, sendo quantificado o comprimento da placa de Cx-43 a partir de imagens de cinco campos/animal.

### **3.8. Extração e dosagem de proteínas**

Para a extração de proteínas o tecido cardíaco dos animais coletado em 120 e 150 dpi, foi pesado e adicionado 1ml de tampão de extração (NaCl 0,4M/ 0,05% tween 20/ 1:100 *cocktail* de inibidores de protease (Sigma) / 0,1mM PMSF / PBS) a cada 100 mg de tecido. Em seguida foi realizada a lise proteica do tecido com 3

ciclos de ultrasom-gelo. As amostras foram então mantidas a -70°C até a realização do ensaio.

A quantidade total de proteínas solúveis foi dosada pelo kit de dosagem RCDC (BioRad). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 750nm e a curva padrão foi elaborada utilizando concentrações conhecidas de albumina soro bovina (BSA) que variaram entre 0,2 mg/ml e 1,4 mg/ml.

### **3.9. Eletroforese**

Foram utilizadas 20 µg de proteína do coração de cada animal e diluídas em tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,002% azul de bromofenol) em volume final de 15 µl. A mistura foi aquecida a 100°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 12% (0,375 M de Tris-HCl pH 8,8; 30% acrilamida/ 0,8% bis-acrilamida 12%; 0,1% SDS (dodecil sulfato de sódio); 0,1% persulfato de amônio e 0,01% TEMED). As proteínas foram separadas eletroforéticamente em tampão de corrida Laemmli (24,6 mM Tris base; 192 mM glicina; 3,48 Mm SDS) à 200V.

### **3.10. Transferência**

Após a eletroforese as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, GE), em tampão de transferência (25 mM Tris base; 192 mM glicina; 20% etanol) à 100V por 1h à 4°C. Após a transferência a membrana foi corada com kit de coloração reversível, MemCode TM Reversible Protein Stain (Pierce), para a visualização da eficiência da transferência de proteínas. Posteriormente foi feita a saturação proteica da membrana utilizando-se uma solução de 5% leite desnatado em TBS-tween (Tris 100 mM pH 7,4; NaCl 150 Mm; 0,1% Tween 20) durante 2h em temperatura ambiente.

### 3.11. Western Blot

Após o período de saturação a membrana foi lavada 2 vezes com TBS-tween por 5 minutos cada. Em seguida foi incubada com anticorpos primários (Tabela 3.2) diluídos em 5% leite desnatado em 0,1% TBS-tween, overnight à 4°C. Após a incubação a membrana foi lavada duas vezes com 0,1% TBS-tween e duas vezes com TBS (Tris 100 mM pH 7,4; NaCl 150 mM) com duração de 5 minutos cada lavagem. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo (animal em que foi preparado o anticorpo primário) (Tabela 3.2) conjugado a peroxidase, diluídos em 5% leite desnatado em 0,1% TBS-tween, por 1h em temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi novamente lavada duas vezes com 0,1% TBS-tween e duas vezes com TBS por 5 minutos.

A imunomarcação foi revelada por incubação de 5 minutos com solução de revelação SuperSignal West PicoChemiluminescent Substrate (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante e em seguida exposta ao filme em diferentes tempos, revelada e fixada em soluções Kodak GBX.

Tabela 3.2 – Anticorpos primários e secundários

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Diluição</b>	<b>Anticorpos secundarios</b>	<b>Diluição</b>
anti-MMP2 (Sigma)	1:1000	anti-coelho	1:10000
anti-TIMP1 (Sigma)	1:1000	anti-coelho	1:10000
anti-TIMP2 (Sigma)	1:1000	anti-coelho	1:10000
anti-TIMP4 (Sigma)	1:1000	anti-coelho	1:10000
anti-Troponina T (Sigma)	1:500	anti-coelho	1:10000
anti-GAPDH (Ambion)	1:5000	anti-camundongo	1:10000

### 3.12. Zimografia

Para avaliação das atividades proteolíticas das metaloproteases 2 e 9, foi utilizado 40 µg das amostras misturadas com tampão de amostra (sem β mercaptoetanol) e aplicadas em géis SDS-PAGE 12% com 0,1% de gelatina



incorporada como substrato. Em seguida, foi realizada corrida eletroforética, em 200V. Após a corrida, os géis foram incubados sequencialmente sob agitação nas seguintes soluções: (i) 2,5% Triton X 100/H<sub>2</sub>O, durante 15 minutos; (ii) 2,5% Triton X-100/50 Mm Tris-Cl pH 7,5, durante 15 minutos; (iii) 50 Mm Tris-Cl pH 7,5, duas vezes durante 10 minutos cada; (iv) 50 Mm Tris-Cl pH 7,5/ 10 mM CaCl<sub>2</sub>, “overnight” a 37°C. Após as incubações, os géis foram corados com 0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) e descorados em solução de 30% etanol/ 7% ácido acético até se obter o melhor contraste entre o fundo do gel (de cor azul) e as bandas (de cor branca). A análise densitométrica das bandas foi feita no programa Quantity One® (BioRad).

### **3.13. Extração e dosagem de RNA**

Foram utilizadas amostras do tecido cardíaco pesando entre 20-30 mg dos animais dos diferentes grupos experimentais. Em seguida, em tubos livres de RNase, foi adicionado 1ml de Trizol para cada amostra de tecido e o material foi submetido a 3 ciclos de 10 segundos de ultrasson-gelo para a lise do tecido. Após a lise do tecido, as amostras foram tratadas com proteinase K e incubadas por 30 minutos a 56°C. Em seguida foi adicionado 200 µl de clorofórmio em cada amostra. Após as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 18 minutos a temperatura de 2 a 8°C. Após a centrifugação a mistura se separou em duas fases: uma fase inferior vermelha (fase orgânica) e uma fase superior incolor (fase aquosa), onde fica exclusivamente o RNA. A fase aquosa foi aspirada e transferida para um novo tubo livre de RNase e adicionado um volume de etanol para cada amostra igual ao volume que foi aspirado. Em seguida foi dado continuidade ao procedimento de extração utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração, o RNA foi dosado por espectrofotometria utilizando o aparelho Picodrop Spectrophotometry, a leitura de absorvância em 260 nm e 280 nm foi realizada e a pureza do RNA foi determinada pela razão das absorvâncias a 260/280 nm. Foram realizados géis para verificação da integridade do RNA: Gel de 1% agarose com 0,7% formaldeído.

### **3.14. RT-qPCR**

O RNA foi tratado com DNase utilizando o kit DNase I Amplification Grade (Sigma), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida foi realizada a transcrição reversa para a síntese do cDNA utilizando o kit Superscript III, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram utilizadas para a amplificação quantitativa dos genes alvos (MMP-2, MMP-9, GATA-4, GATA-6, NKX2-5, T-Box5, titina cardíaca, troponina T e desmina) e como candidatos a genes de referência foram utilizados GAPDH e  $\beta$ -actina. Para a amplificação dos genes alvos foi utilizado o sistema de sondas fluorescentes TaqMan® (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante.

Foram utilizados 2  $\mu$ l da amostra de cDNA adicionados a uma mistura (MasterMixTaqman; Primer+Sonda (específica para o gene alvo); H<sub>2</sub>O de vacina). A amplificação quantitativa foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies), utilizando o programa ViiA™ 7 Software (Life Technologies). Todas as amostras foram testadas em duplicatas e os valores de RQ e Delta Ct foram considerados para análise, realizada através do método da quantificação relativa ( $\Delta\Delta$ Ct) (Livak & Schmittgen, 2001).

### **3.15. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram avaliados por testes estatísticos através do software GraphPadPrism. Foram realizados testes não paramétricos pelo Mann Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*)

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Investigação do papel de Conexina-43 e sua possível relação na recuperação da condução do impulso elétrico após tratamento com GW788388**

A proteína de junção celular do tipo gap, Conexina-43 (Cx-43), é amplamente conhecida por sua importância na condução do impulso elétrico (Spray e Burt, 1990). Assim, com base em dados paralelos obtidos por nosso grupo, que demonstraram que a infecção crônica de camundongos fêmeas C57Bl/6 por *T. cruzi* cepa Colombiana (mesmo modelo experimental utilizado no presente trabalho) leva ao comprometimento da condução elétrica cardíaca desses animais e demonstrando ainda que o composto inibidor da via de sinalização de TGF- $\beta$ , GW788388, foi capaz de reverter estes danos (Dados em submissão), investigamos então se CX-43 poderia estar envolvida no mecanismo de ação do composto na melhora da condução elétrica cardíaca dos animais.

#### **4.1.1. Avaliação da organização de Cx-43**

Para determinar se o efeito benéfico na frequência cardíaca dos animais, observado após o tratamento com GW788388, poderia ser mediado pelo rearranjo de Cx-43 no coração, avaliamos então a organização destas proteínas no tecido cardíaco dos animais cronicamente infectados, através da técnica de imunohistologia.

Observamos que camundongos não infectados apresentavam Cx-43 organizadas como estrutura de placas (Figura 4.1A, setas finas). A infecção crônica pelo *T. cruzi* desorganizou a estrutura de placas formada pela Cx-43, especialmente 150 dpi (Figura 4.1B-C, setas largas), apresentando um padrão pontilhado. Essa desorganização pode então estar associada ao comprometimento da condução do impulso elétrico, observado nos animais cronicamente infectados. Ambos os esquemas de tratamento com GW788388, uma vez e três vezes por

semana, foram capazes de reestabelecer a organização de placas de Cx-43. Esta reorganização de Cx-43 observada no tecido cardíaco após o tratamento com GW788388 (Figura 4.1D-E, setas finas) possivelmente contribuiu para a recuperação da condução elétrica cardíaca dos animais (Dados em submissão).

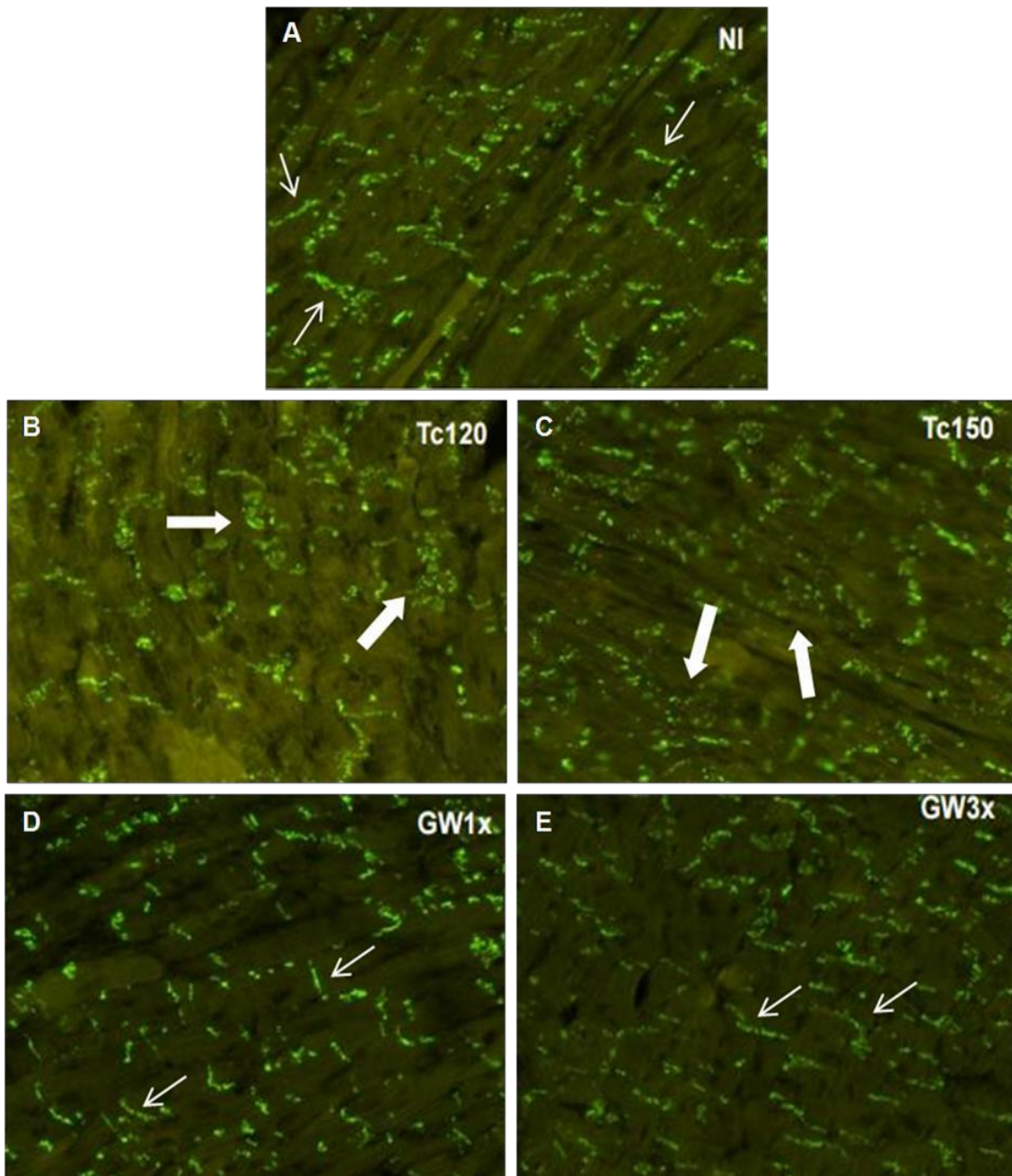


Figura 4.1: Organização de Cx-43 pela técnica de Imunohistologia no coração dos camundongos: (A) não infectados; (B) infectados por *T. cruzi* cepa Colombiana não tratados em 120 e (C) 150 dpi; e infectados pelo *T. cruzi* e tratados com GW 788388 em dois esquemas diferentes (D) 1x por semana e (E) 3x por semana. Aumento de 200x. Seta fina indica organização de Cx-43 não alterada. Seta larga indica desorganização de Cx-43. N= 3 NI / 3 Tc120 / 3 Tc150 / 3 Tc+GW1x / 3 Tc+GW3x.

#### 4.1.2. Análise do comprimento das placas de Cx-43

Complementarmente à análise qualitativa relativa à organização de Cx-43 no tecido cardíaco dos animais, foi realizada a quantificação do comprimento das estruturas de placas formadas por Cx-43. A análise demonstrou que camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi*, apresentam placas de Cx-43 significativamente menores, quando comparados a camundongos não infectados, contribuindo para o aspecto pontilhado de Cx-43 observado na imagem anterior nos grupos infectados não tratados. A análise demonstrou também que o tratamento com GW788388, reverteu a perda das estruturas de placas de Cx-43 induzidas pela infecção, preservando seu comprimento, uma vez que o tamanho das placas em camundongos tratados foi semelhante ao grupo não infectado (Figura 4.2).

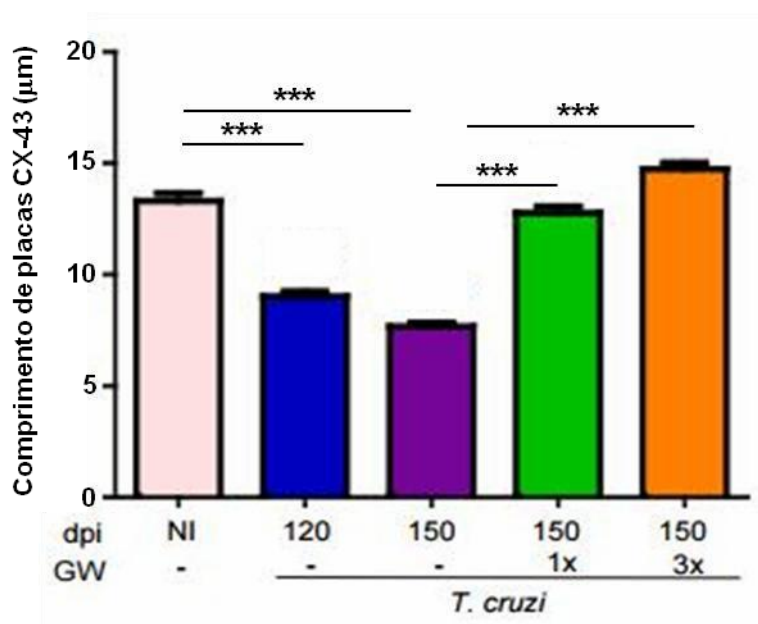


Figura 4.2: Gráfico representando o comprimento de placas de Cx-43 no tecido cardíaco dos camundongos: não infectados (NI), infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Asterisco indica diferenças significativas entre os grupos (\*\*\*)  $p < 0,001$ )  $N = 3$  NI / 3 Tc120 / 3 Tc150 / 3 Tc+GW1x / 3 Tc+GW3x.

## **4.2. Investigação dos mecanismos envolvidos na reversão da fibrose cardíaca após tratamento com GW788388**

Dados paralelos do grupo também demonstram a reversão da fibrose cardíaca em resposta ao tratamento com GW788388 em modelo experimental da doença de Chagas crônica, observados pela redução da expressão de componentes de matriz extracelular associados à fibrose, como fibronectina e colágeno (Dados em submissão). Assim, para compreender os mecanismos pelos quais ocorre a reversão do processo fibrótico após o tratamento, analisamos o perfil de expressão e atividade das metaloproteases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), responsáveis pela degradação de componentes de matriz extracelular. Além disso, avaliamos ainda a expressão de TIMPs, conhecidos como inibidores da atividade de metaloproteases.

### **4.2.1. Avaliação da expressão gênica de MMP-2 e MMP-9**

Para avaliar se o efeito reversor da fibrose cardíaca frente ao tratamento com GW788388, poderia estar associado a degradação da matriz extracelular envolvendo MMP-2 e MMP-9, realizamos a quantificação de RNAm pela técnica de RT-qPCR, para determinar a expressão gênica destas proteínas no coração dos animais infectados por *T. cruzi*, tratados ou não com GW788388.

Os resultados demonstraram que a expressão gênica de MMP-2 no coração dos animais tem uma tendência a redução com a infecção crônica, entretanto não é estatisticamente significativo (Figura 4.3A). Entretanto, a expressão gênica de MMP-9 no coração dos animais apresentou queda acentuada em 150 dias após a infecção pelo *T. cruzi* e o tratamento com GW788388 induziu aumento da expressão desta molécula tanto com o esquema de tratamento de uma vez por semana quanto com o esquema de tratamento de três vezes por semana (Figura 4.3B). Essas alterações na expressão de MMP-9 podem refletir um possível envolvimento desta proteína no processo fibrótico na doença de Chagas crônica e na reversão deste processo após o tratamento com GW788388. No entanto, as

metaloproteases sofrem regulação em diversos níveis, assim a expressão gênica pode não estar diretamente relacionada à sua atividade, sendo então relevante a avaliação da expressão proteica assim como de sua atividade por zimografia.

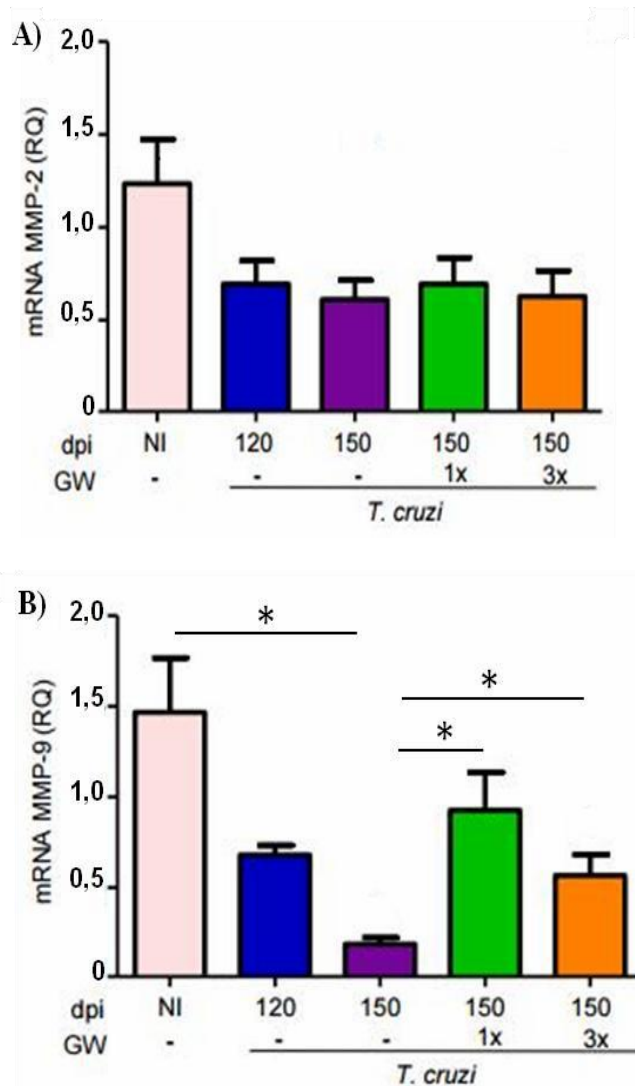


Figura 4.3: Avaliação da expressão gênica de MMP-2 (A) e MMP-9 (B) por RT-qPCR no coração dos camundongos: não infectados (NI) e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Asterisco indica diferenças significativas entre os grupos (\* $p < 0,05$ ). N= 4 NI / 6 Tc120 / 7 Tc150 / 5 Tc+GW1x / 7 Tc+GW3x.

#### 4.2.2. Avaliação da expressão proteica de MMP-2

De modo a avaliar se os níveis de expressão gênica eram equivalentes aos níveis de expressão proteica, foram realizados ensaios de *Western blot* para análise da expressão de MMP-2 no tecido cardíaco dos camundongos infectados tratados ou não com GW788388. A análise demonstrou que assim como foi observado em relação à expressão gênica de MMP-2, a expressão proteica desta molécula no coração dos animais também não é alterada frente à infecção crônica e frente ao tratamento com GW788388 (Figura 4.4).

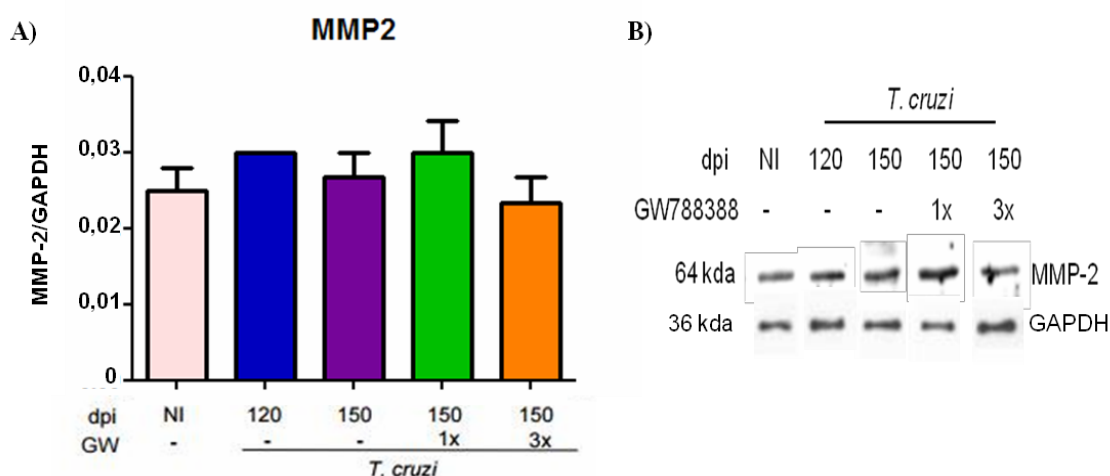


Figura 4.4: Avaliação da expressão de MMP-2 no coração dos camundongos não infectados (NI), e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Gráfico representando a média utilizando o programa QuantityOne (BioRad) para MMP-2 (A). Análise por *Western blot* utilizando anticorpo anti-MMP-2 (B). N= 4 NI / 3 Tc120 / 3 Tc150 / 4 Tc+GW1x / 4 Tc+ GW3x.



#### **4.2.3. Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9**

Uma vez que as metaloproteases são sintetizadas na forma inativa, a expressão pode não corresponder à atividade destas proteínas. Dessa forma, avaliamos então a atividade das metaloproteases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) através da utilização da técnica de zimografia para determinar se estas moléculas estariam participando ativamente na degradação de matriz extracelular no processo de reversão da fibrose cardíaca após o tratamento com GW788388.

Os resultados da zimografia demonstraram uma queda na atividade de MMP- 2 em 150 dias após a infecção, tendo uma queda mais acentuada com o tratamento com GW788388 no esquema de 1 vez por semana (Figura 4.5A-B). No entanto, o tratamento com GW788388 no esquema de 3 vezes por semana foi capaz de induzir maior atividade de MMP-2 em relação ao grupo infectado não tratado em 150 dias após a infecção (Figura 4.5A-B).

Os dados em relação à atividade de MMP-9 demonstraram também que a infecção crônica por *T. cruzi* leva a uma redução na sua atividade em 150 dias após a infecção (Figura 4.5C-D). Ambos os esquemas de tratamento com GW788388, uma vez e três vezes por semana, induziram um aumento da atividade de MMP-9, indicando uma possível maior atividade na degradação de matriz extracelular (Figura 4.5C-D).

#### **4.2.4. Avaliação dos níveis circulantes de TIMP-1**

Para compreender os mecanismos de regulação da atividade das metaloproteases analisadas, avaliamos os níveis circulantes de TIMP-1, um dos moduladores da atividade das MMPs, através da técnica de ELISA, buscando avaliar se a variação da atividade de MMP-2 poderia estar relacionada aos níveis de um de seus inibidores.

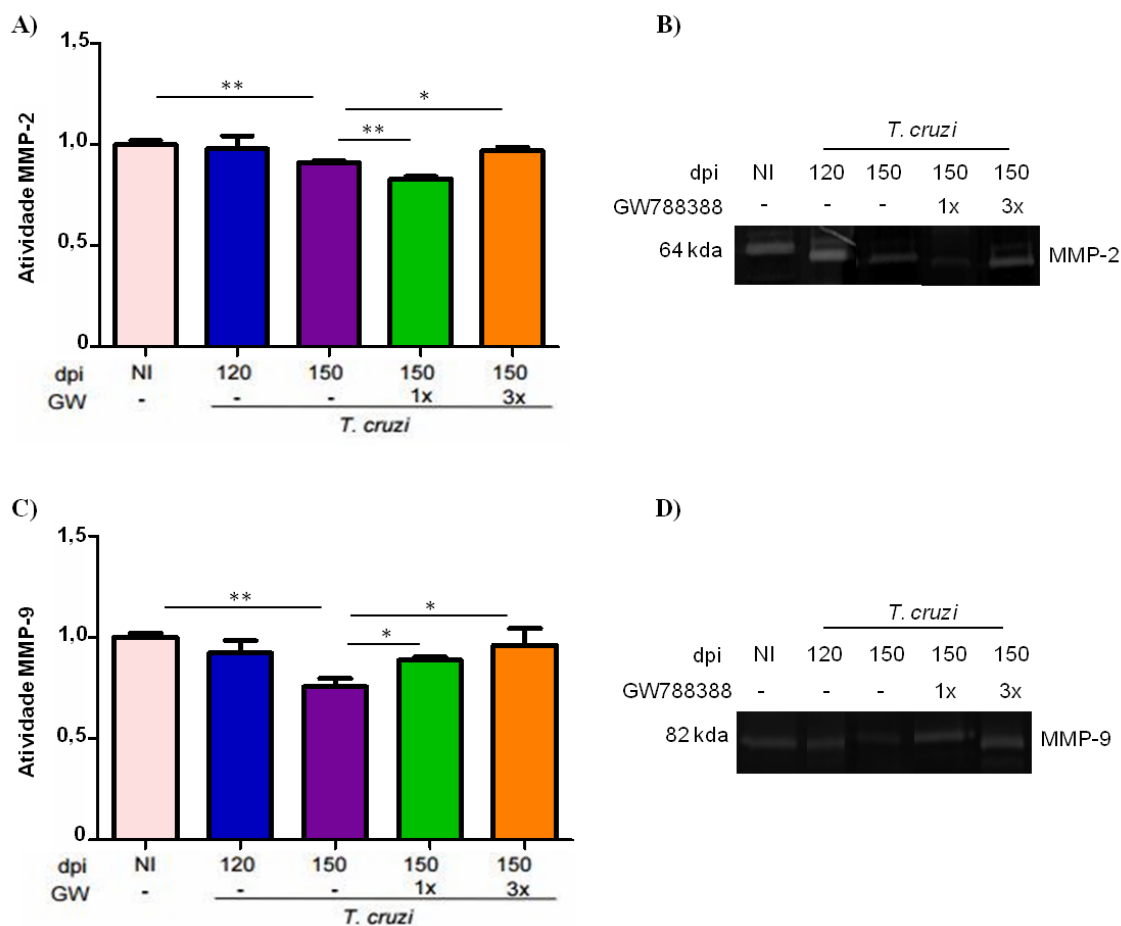


Figura 4.5: Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9 pela técnica de zimografia em extrato proteico do coração dos camundongos: não infectados (NI) e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Gráfico representando a média utilizando o programa QuantityOne (BioRad) para MMP-2 (A). Análise de MMP-2 por *Zimografia* utilizando Coomassie Blue (B). Gráfico representando a média utilizando o programa QuantityOne (BioRad) para MMP-9 (C). Análise de MMP-9 por *Zimografia* utilizando Coomassie Blue (D). Asterisco indica diferenças significativas entre os grupos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). N= 9 NI / 7 Tc120 / 7 Tc150 / 4 Tc+GW1x / 9 Tc+GW3x.

Os dados de ELISA demonstraram níveis mais elevados de TIMP-1 circulante em 120 dias após a infecção, com uma significativa queda em 150 dias após a infecção. Mesmo com a queda, os níveis de TIMP-1 observados em 150 dias de infecção são aumentados quando comparados aos animais não infectados. O tratamento com o composto GW788388 em ambos os esquemas de tratamento, uma vez e três vezes por semana, apresentaram aumento nos níveis de TIMP-1 quando comparados ao grupo não infectado e ao grupo infectado não tratado no 150º dia de infecção. Assim, não observamos correlação entre os níveis

circulantes de TIMP-1 e a atividade de MMP-2 e MMP-9 no coração (Figura 4.6) já que seria esperado níveis mais baixos de TIMP-1 frente ao tratamento com GW788388, favorecendo a maior atividade enzimática observada no ensaio de zimografia.

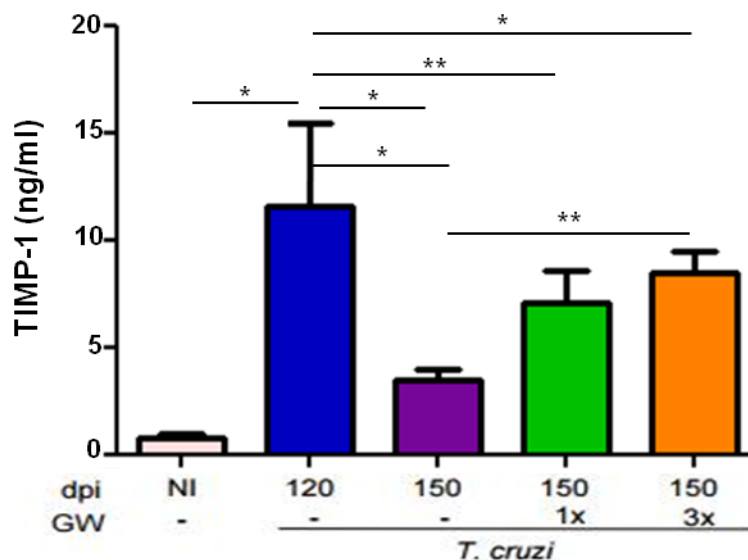


Figura 4.6: Gráfico dos níveis circulantes de TIMP-1 pela técnica de ELISA no soro dos camundongos: não infectados (NI) e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Asterisco indica diferenças significativas entre os grupos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). N= 3 NI / 3 Tc120 / 4 Tc150 / 5 Tc+GW1x / 4 Tc+GW3x.

#### 4.2.5. Avaliação da expressão cardíaca de TIMPs

Ainda buscando compreender as diferenças observadas entre a expressão e atividade das MMPs- 2 e 9, avaliamos então a expressão de seus inibidores TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 *in locu* no coração dos animais, utilizando a técnica de *Western blot*.

Os dados de *Western blot*, demonstraram que os camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* apresentam aumento acentuado na expressão cardíaca de todos os TIMPs (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4) analisados, no 150º dia de infecção

(Figura 4.7A-D). Além disso, TIMP-4 apresentou expressão significativamente aumentada no coração também em 120 dias após a infecção (Figura 4.7C).

Os resultados demonstraram ainda que a expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 no coração dos camundongos com doença de Chagas crônica, foram significativamente reduzidas em resposta a ambos os esquemas de tratamento com GW788388, uma vez e três vezes por semana (Figura 4.7A-D).

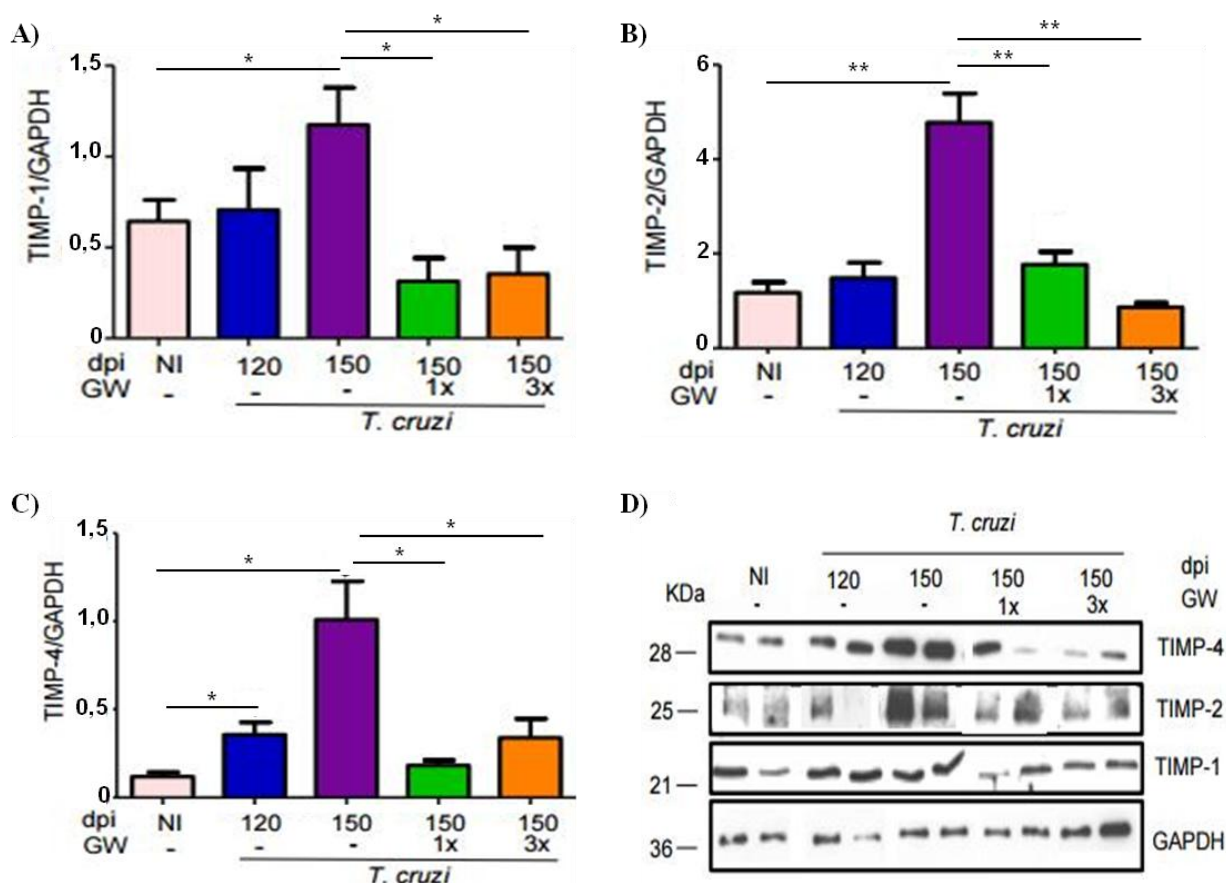


Figura 4.7: Avaliação da expressão de TIMPs no coração dos camundongos não infectados (NI), e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Gráfico representando a média utilizando o programa QuantityOne (BioRad) para TIMP-1 (A), TIMP-2 (B) e TIMP-4 (C). Análise por *Western blot* utilizando anticorpo anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 e anti-TIMP-4 (D). \$ indica diferenças significativas dos grupos infectados em relação ao grupo não infectado (\$ $p < 0,05$ ; \$\$ $p < 0,01$ ). Asterisco indica diferenças significativas entre os grupo infectado tratados com o grupo infectado d150 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). N= 4 NI / 3 Tc120 / 3 Tc150 / 4 Tc+GW1x / 4 Tc+ GW3x.

### **4.3. Investigação do potencial de regeneração cardíaca após tratamento com GW788388**

Uma vez que o tratamento com o composto GW788388 foi capaz de reverter processos fibróticos já estabelecidos no coração de camundongos durante a fase crônica da doença de Chagas, com potencial mecanismo de ação envolvendo atividade de metaloproteases 2 e 9. Investigamos então se o tratamento com GW788388 seria capaz ainda de induzir a regeneração cardíaca pela diferenciação em novos cardiomiócitos, através da análise da expressão de marcadores de regeneração cardíaca.

#### **4.3.1. Análise da expressão gênica de marcadores de regeneração cardíaca**

Para avaliar se o tratamento com GW788388 seria capaz de induzir a diferenciação de novos cardiomiócitos, foi realizada a análise da expressão gênica dos marcadores de regeneração cardíaca: GATA-4, GATA-6, T-Box5, NKX2-5, Titina cardíaca, Troponina T, e Desmina, no tecido cardíaco dos animais, através da técnica de RT-qPCR.

Os dados de RT-qPCR demonstraram que a infecção crônica levou a queda na expressão gênica de todos os alvos selecionados, tanto em 120 quanto em 150 dpi (Figura 8.4A-E / Figura 9.4A-B). O tratamento com GW788388, tanto uma vez quanto três vezes por semana, não alterou a expressão dos marcadores NKX2-5, GATA-4, Titina cardíaca, Troponina T e Desmina, quando comparados ao grupo infectado (Figura 8.4A-E).

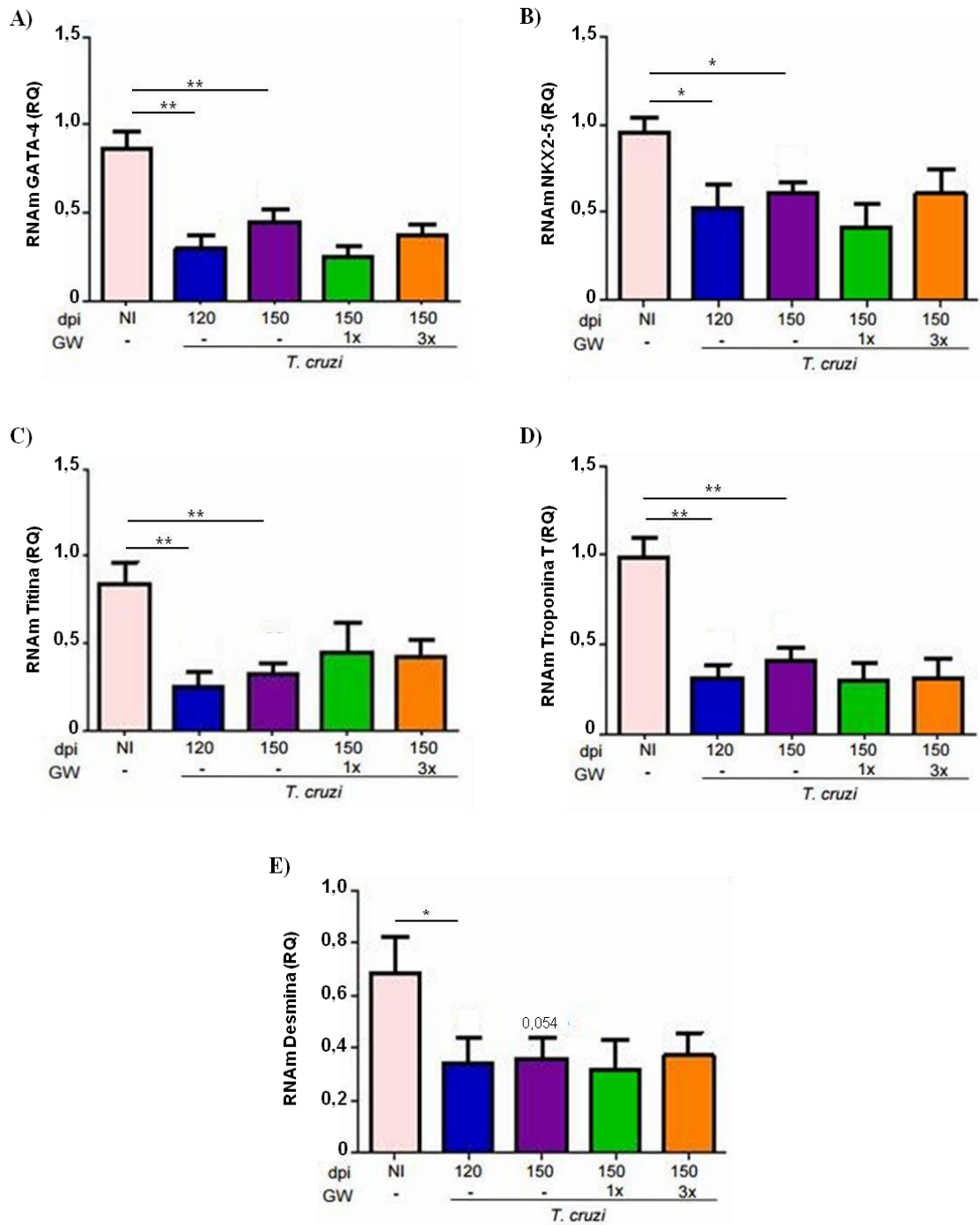


Figura 4.8: Avaliação da expressão gênica de marcadores de regeneração cardíaca: GATA-4 (A), NKX2-5 (B), Titina (C), Troponina T (D) e Desmina (E), por RT-qPCR no coração dos camundongos: não infectados (NI) e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Asterisco indica diferenças significativas entre os grupos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). N= 6 NI / 6 Tc120 / 6 Tc150 / 5 Tc+GW1x / 7 Tc+GW3x.

Além disso, nossos resultados demonstraram também que o tratamento com o composto GW788388, no esquema de três vezes por semana, foi capaz de induzir aumento da expressão gênica dos marcadores GATA-6 e T-Box5 no coração dos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, sugerindo assim, que este esquema de tratamento pode ser suficiente para induzir a regeneração cardíaca pela diferenciação de novos cardiomiócitos (Figura 4.9A-B).

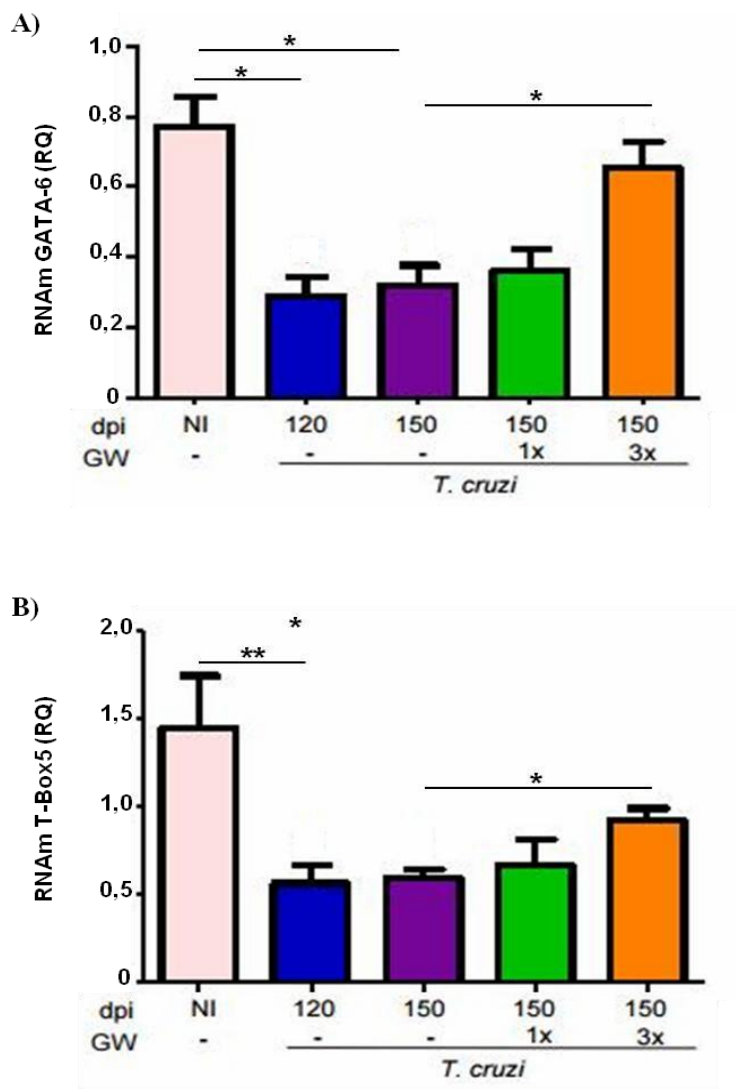


Figura 4.9: Avaliação da expressão gênica de marcadores de regeneração cardíaca: GATA-6 (A), T-Box5 (B), por RT-qPCR no coração dos camundongos: não infectados (NI) e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Asterisco indica diferenças significativas entre os grupos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). N= 6 NI / 6 Tc120 / 6 Tc150 / 5 Tc+GW1x / 7 Tc+GW3x.

### 4.3.2. Avaliação da expressão proteica de Troponina T

De modo a avaliar se os níveis de expressão gênica eram equivalentes aos níveis de expressão proteica, foram realizados ensaios de *Western blot* para análise da expressão de Troponina T no tecido cardíaco dos camundongos infectados tratados ou não com GW788388. A análise demonstrou que assim como foi observado em relação à expressão gênica, a expressão proteica de Troponina T é significativamente reduzida no coração dos animais cronicamente infectados, não sendo alterada com o tratamento, apresentando padrão semelhante ao que foi observado em relação à expressão gênica (Figura 4.10).

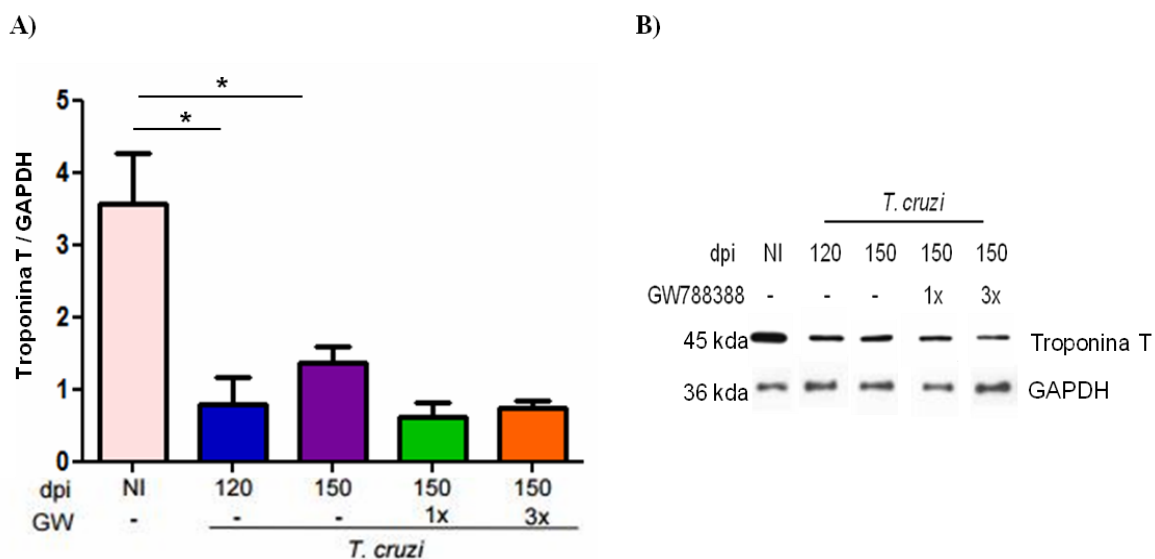


Figura 4.10: Avaliação da expressão de Troponina T no coração dos camundongos não infectados (NI), e infectados pelo *T. cruzi* nos dias 120 e 150 não tratados; e infectados por *T. cruzi* e tratados com GW788388 em dois esquemas diferentes: 1x e 3x por semana. Gráfico representando a média utilizando o programa QuantityOne (BioRad) para Troponina T (A). Análise por *Western blot* utilizando anticorpo anti- MMP-2 (B). N= 3 NI / 3 Tc120 / 4 Tc150 / 4 Tc+GW1x / 4 Tc+ GW3x.



## 5. DISCUSSÃO

Na fase crônica da doença de Chagas o achado histopatológico mais importante observado é a fibrose, juntamente com a inflamação, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, estando associado ao aumento da deposição e expressão de proteínas de matriz extracelular (revisto por Rossi, 1998). TGF- $\beta$  se destaca como um importante indutor desse processo, dessa forma, seu papel biológico como mediador chave na patogênese do processo de fibrose e remodelamento cardíaco vem estimulando o desenvolvimento de terapias baseadas na inibição de TGF- $\beta$  como estratégias para a reversão da fibrose. Compostos que inibem a atividade de TGF- $\beta$  já demonstraram inibir a expressão de genes relacionados à fibrose e prevenir fibrose vascular (Liu et al., 2005; Fu et al., 2008).

GW788388 é um potente composto ativo por via oral, inibidor da atividade de TGF- $\beta$ , através do bloqueio de sua via de sinalização, agindo tanto no receptor tipo I quanto no receptor tipo II de TGF- $\beta$ , que já demonstrou ser capaz de reduzir fibrose renal em modelo *in vivo* (Petersen et al., 2008). Em estudo realizado pelo nosso grupo, foi demonstrado que a administração do composto GW788388, em baixas doses (3mg/kg em dose única), foi capaz de reverter a fibrose cardíaca observada no final da fase aguda experimental da doença de Chagas (de Oliveira et al., 2012), indicando assim que este composto poderia ter potencial efeito terapêutico na reversão da fibrose durante a fase crônica da doença de Chagas.

Assim, foi avaliado pelo nosso grupo se o tratamento com GW788388 durante a fase crônica experimental da doença de Chagas também poderia ter efeito benéfico. Este estudo, realizado em paralelo ao presente trabalho, avaliou o efeito do composto GW788388 em dois esquemas de tratamento: 1x e 3x por semana, administrado por 30 dias. Foi observado que o tratamento diminui os níveis circulantes de TGF- $\beta$ , melhora parâmetros eletrocardiográficos e da expressão e deposição de colágeno tipo I e fibronectina no tecido cardíaco. Esses dados demonstram que o tratamento com GW788388 recupera a condução elétrica cardíaca e reverte fibrose no coração de camundongos acometidos pela CCC (Dados em submissão).

Assim, no presente trabalho avaliamos os possíveis mecanismos pelos quais o tratamento com o composto GW788388 induz a reversão da fibrose e o remodelamento cardíaco. Além disso, avaliamos também a capacidade de regeneração cardíaca após a reversão do dano no coração dos animais cronicamente infectados em resposta ao tratamento. Para este estudo foi utilizado modelo pré-clínico de infecção crônica de camundongos C57Bl/6 inoculados com *T. cruzi* cepa Colombiana, que reproduz em 120 dias de infecção características clínicas relevantes da Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) (Silverio et al., 2010; Pereira et al., 2015). Foram analisados os tecidos cardíacos dos animais nos dias 120 dpi e após 30 dias de tratamento com GW788388 (150 dpi), em dois esquemas de tratamento: uma vez e três vezes por semana. Sabe-se que TGF- $\beta$  expresso em níveis elevados pode ser prejudicial para a função cardíaca, promovendo excesso de deposição de matriz extracelular, aumento da rigidez miocárdica e disfunção diastólica (Dobaczewski et al., 2011). No entanto, é necessário manter os níveis basais de TGF- $\beta$  preservados uma vez que esta é uma citocina pleiotrópica com uma diversidade de funções reguladoras, por estes motivos foram testados estes diferentes esquemas terapêuticos, com o objetivo de reduzir a possibilidade de bloqueio completo de TGF- $\beta$  e por conseguinte possíveis efeitos colaterais resultados por baixos níveis desta citocina.

A fibrose é a principal alteração estrutural do coração na CCC, em que o acúmulo progressivo de componentes de matriz extracelular interfere na contratilidade e propriedades elétricas do miocárdio, levando ao desenvolvimento de arritmias (Rossi, 1998). Em nosso estudo, para compreender o que poderia influenciar nas alterações eletrocardiográficas durante a CCC, e como o tratamento com GW788388 recupera a condução elétrica cardíaca, analisamos a característica da marcação de Cx-43 no tecido cardíaco, tendo em vista que já foi relatado o papel determinante das junções comunicantes de Cx43 na condução do impulso elétrico no miocárdio. Alterações nas estruturas de Cx43 podem ser responsáveis por anomalias de propagação do impulso elétrico, contribuindo para ineficiência mecânica e arritmias do miocárdio hipertrofiado (Peters et al., 1993), características clínicas constantemente observadas durante na CCC. A marcação de Cx-43 no tecido cardíaco foi realizada por imunofluorescência, e observamos que animais cronicamente infectados por *T. cruzi* apresentam desorganização da estrutura de Cx-43 no coração, esse aspecto observado está em conformidade com

padrões semelhantes descritos em modelo de infecção experimental aguda da doença de Chagas (de Oliveira et al., 2012; de Carvalho, 1994) e em coração de pacientes com CCC (Waghabi et al., 2009a). Ainda, utilizando o mesmo modelo de infecção experimental apresentado no presente trabalho, Pereira e cols. (2014) observaram alterações semelhantes na organização e estrutura de Cx-43, corroborando nossos resultados. Já foi relatado que TGF- $\beta$  pode atuar também como um regulador da expressão de Cx-43, sendo um importante mediador para a comunicação celular através das junções comunicantes (Hurst et al., 1999), uma vez que já foi descrito que na CCC os níveis de TGF- $\beta$  encontram-se elevados (Araújo-Jorge et al. 2002), essas alterações na expressão de TGF- $\beta$  podem estar contribuindo também para as alterações na organização de Cx-43 observadas no tecido cardíaco, corroborando esta hipótese, já foi proposto que níveis elevados de TGF- $\beta$  durante a infecção por *T. cruzi* desorganizam as junções do tipo gap (Waghabi et al., 2009a). Além disso, foi observado ainda que a infecção crônica experimental da doença de Chagas, não só desorganiza como também leva à diminuição do comprimento das placas de Cx-43, assim como foi observado na fase aguda experimental da doença (de Oliveira et al., 2012). Dessa forma, tal aspecto de desorganização das estruturas de Cx-43 no coração, associadas à fibrose, podem ser responsáveis pela condução anormal do impulso elétrico observada na doença de Chagas crônica, levando a um agravamento da cardiomiopatia.

O tratamento com GW788388 reestabeleceu o padrão normal das placas de Cx-43, preservando a organização, estrutura e o comprimento das placas. Este padrão de organização de Cx-43 observado com a inibição da atividade de TGF- $\beta$  está de acordo com o que foi observado por Waghabi et al. (2009a) e de Oliveira et al. (2012), o que demonstra o efeito direto da sinalização de TGF- $\beta$  sobre a organização de Cx-43. Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que o tratamento com GW788388, inibindo a sinalização de TGF- $\beta$ , favorece uma transmissão regular e correta do impulso elétrico cardíaco.

Uma vez observada a reversão da fibrose em resposta ao tratamento com GW788388, avaliamos os possíveis mecanismos que estariam mediando este processo. O processo de remodelamento e regulação dos componentes de matriz extracelular envolve um mecanismo de controle entre os níveis e atividade de metaloproteases de matriz (MMPs) e dos seus inibidores teciduais (TIMPs), assim,

a atividade das MMPs é regulada por TIMPs por meio de formação de complexos não covalentes (Zhang et al., 2014). Dessa forma, o volume das proteínas de matriz extracelular é dependente do equilíbrio entre sua produção e degradação, mediada principalmente pelas metaloproteases e inibição por TIMPs, alterações destas proporções geram processos patológicos como a fibrose.

Fares et al. (2013) demonstraram níveis séricos elevados de MMP-9 em pacientes crônicos com a forma cardíaca da doença de Chagas, associados com a gravidade da doença de Chagas. Em contraste, nossos resultados demonstraram que a expressão gênica de MMP-9 avaliada diretamente no coração, é significativamente reduzida com a infecção crônica. TGF- $\beta$  é considerada uma molécula fibrogênica por estimular a produção de componentes de matriz extracelular, inibindo a transcrição de MMPs, como demonstrado por Han et al., 2001; Yuan e Varga 2001. Como já foi descrito, a infecção por *T. cruzi* aumenta os níveis de TGF- $\beta$  em modelo experimental agudo (Ferreira et al., 2016) e em pacientes portadores da doença de Chagas na fase crônica (Araújo-Jorge et al., 2002). Tal fato poderia explicar a redução da expressão gênica cardíaca de MMP-9 observada em nossos resultados.

Observamos que o tratamento com GW788388 aumenta a expressão gênica de MMP-9, indicando que a inibição da sinalização de TGF- $\beta$  induz o aumento da síntese de MMP-9, o que possivelmente pode contribuir para uma maior degradação de matriz extracelular, e por conseguinte reversão da fibrose cardíaca.

A análise da expressão gênica demonstrou ainda que expressão de MMP-2 não é alterada tanto em relação à infecção crônica quanto ao tratamento. Para avaliar se a expressão de MMP-2 é suscetível a alterações pós-transcricionais, analisamos a expressão proteica desta metaloprotease no coração. Os dados do *Western Blot* corroboraram os dados de RT-qPCR, demonstrando também que a infecção crônica e o tratamento por GW788388 não alteram a expressão proteica de MMP-2 no coração, indicando assim que esta metaloprotease não é regulada em níveis pós-transcricionais. Sabe-se que MMP-2 é expressa de forma constitutiva, sendo pouco responsiva a estímulos, enquanto que a expressão de MMP-9 é susceptível a estímulos, sendo alterada mais facilmente (Opdenakker et al., 2001), este fato pode explicar a ausência de variação da expressão de MMP-2 e modulação de expressão de MMP-9 frente à infecção e ao tratamento com

GW788388 observada em nossos resultados.

Como as metaloproteases têm sua atividade altamente regulada em diversos níveis, desde sua síntese, secreção, ativação e pós-ativação (Spinale, 2007), os seus níveis de transcrição e tradução podem não ser diretamente correlacionados com a sua atividade. MMP-2 e MMP-9 são gelatinases (Souza e Line, 2002; Amălinei et al., 2007), o que permite a avaliação da sua atividade por ensaios de Zimografia. E embora não tenhamos observado variação na expressão gênica e proteica de MMP-2, observamos uma redução na sua atividade em 150 dias após a infecção. Essa redução também foi observada em relação à atividade de MMP-9. Esses dados reforçam a ideia do envolvimento de MMP-2 e MMP-9 no mecanismo de desenvolvimento da fibrose cardíaca frente à infecção crônica, uma vez que a atividade de proteínas responsáveis pela degradação de matriz extracelular está reduzida neste período da infecção, ocorre o favorecimento do aumento da deposição de MEC, e conseqüentemente a formação da fibrose cardíaca.

O tratamento com GW788388 no esquema de tratamento de uma vez por semana, não foi suficiente para induzir o aumento da atividade de MMP-2 no coração, entretanto, de forma importante, o tratamento com este composto três vezes por semana aumentou a atividade de MMP-2. Ambos os esquemas de tratamento foram suficientes para induzir aumento da atividade de MMP-9. Este aumento observado na atividade de MMP-2 e MMP-9 frente à inibição de TGF- $\beta$  após o tratamento com GW788388, sugere a participação dessas moléculas no processo de reversão da fibrose cardíaca, uma vez que maior atividade indica maior degradação de matriz extracelular.

Para compreendermos as diferenças observadas entre a expressão e a atividade de MMP-2 e MMP-9, avaliamos os níveis circulantes de TIMP-1, uma vez que esta proteína realiza a regulação da atividade proteolítica das MMPs. Não observamos correlação entre os níveis circulantes de TIMP-1 e a atividade de MMP-2 e MMP-9 no coração. Ou contrário, foi observado maiores níveis de TIMP-1 circulante frente ao tratamento com GW788388, o que indicaria uma maior inibição da atividade das metaloproteases. Como já é conhecido, a atividade de MMPs é controlada pela expressão de seus inibidores específicos (TIMPs) numa proporção de 1:1 (Souza e Line, 2002), assim sendo fundamental a análise da expressão dos TIMPs diretamente no tecido cardíaco, pois como a doença de Chagas é uma

doença sistêmica, os níveis circulantes de TIMP-1 avaliados podem não refletir necessariamente a sua expressão no tecido alvo, o coração.

Como a análise dos níveis circulantes não esclareceram o mecanismo de regulação da atividade de MMP-2 e MMP-9 no coração, avaliamos a expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 no tecido cardíaco. Sabe-se que TIMP-1 inibe preferencialmente a atividade de MMP-9, sendo capaz de se ligar a forma ativa e a forma inativa desta enzima (Pró-MMP-9) assim impedindo também a sua ativação (revisto por Amălinei et al., 2007). Enquanto TIMP-2 se liga preferencialmente à MMP-2, sendo até 10 vezes mais eficaz que o TIMP-1 na inibição da atividade de MMP-2 (Souza e Line, 2002). Já TIMP-4 é capaz de inibir tanto a atividade de MMP-2 quanto MMP-9, além disso a expressão de TIMP-4 é especialmente abundante no coração (revisto por Amălinei et al., 2007), sendo fundamental seu estudo. Embora TIMP-1 e TIMP-2 tenham padrões de ligação preferencial, eles são capazes de inibir quase todos os membros da subclasse das MMPs (McDonnell e Matrisian, 1990).

A expressão dos TIMPs analisados no coração estava inversamente proporcional com a atividade das MMPs observadas, ou seja: quanto menor expressão de TIMPs, maior atividade das MMPs. A infecção crônica provocou um aumento significativo na expressão dos TIMPs -1, -2 e -4, no tecido cardíaco em 150 dias após a infecção, mesmo período em que foi observada a redução da atividade das MMPs -2 e -9. Em conjunto, estes dados reforçam o envolvimento dos alvos analisados na gênese do processo fibrótico, pois a alta expressão de TIMPs associadas à redução da atividade de MMPs, propiciam o cenário ideal para o desenvolvimento de fibrose exacerbada provocada pelo acúmulo de matriz extracelular.

Sabe-se que TGF- $\beta$  atua regulando tanto a expressão de MMPs, quanto suas atividades, por induzir a expressão de TIMPs (Schiller et al., 2004; Bujak e Frangogiannis, 2007). O tratamento com GW788388, favorece a degradação dos componentes de matriz extracelular, uma vez que induziu de forma acentuada a diminuição da expressão cardíaca dos TIMPs analisados, sendo essa queda associada ao aumento da atividade de MMP-2 e -9 observado em resposta ao bloqueio da sinalização de TGF- $\beta$  após o tratamento. A correlação desses resultados observados, enfatizam o envolvimento das MMPs 2 e 9 na reversão da

fibrose cardíaca, uma vez que há a combinação de uma maior atividade e menor expressão de seus inibidores. Dessa forma, GW788388 está possivelmente agindo através da regulação da atividade de MMPs -2 e -9, e da modulação da expressão de TIMPs, favorecendo a atuação equilibrada dessas moléculas.

Além disso, a regulação da atividade das MMPs pode ainda estar sendo mediada por outros mecanismos como inibidores de proteases não específicos como a  $\alpha$ 2-macroglobulina e  $\alpha$ 1-inibidor de protease (Folgueras et al., 2004). Em conjunto, nossos dados indicam também que a sinalização de TGF- $\beta$  está relacionada à modulação da atividade de MMP-2 e MMP-9, uma vez que inibindo sua via, observamos aumento da atividade destas moléculas. Ainda, essa modulação pode estar ocorrendo de forma indireta: TGF- $\beta$  induz a expressão de PAI-I (Chen et al.; Kutz et al., 2001; Dong et al., 2002), e sabe-se que PAI-I atua inibindo a conversão do plasminogênio em plasmina (Franco, 2001), por conseguinte inibe também a ativação das MMPs mediada por plasmina, apresentando-se como o primeiro nível do mecanismo de regulação da atividade de metaloproteases (Franco, 2001; Lee et al., 1996). Dessa forma, bloqueando a via de sinalização de TGF- $\beta$ , é possível que haja menos PAI-I sendo expresso, favorecendo a manutenção das MMPs no seu estado inativo.

Uma vez determinado alguns dos mecanismos de ação pelo qual o tratamento com o composto GW788388 induz reversão da fibrose cardíaca, torna-se importante determinar se este composto também seria capaz de induzir a regeneração cardíaca. Dados paralelos do grupo demonstram que ambos os esquemas de tratamento com GW788388, uma vez e três vezes por semana, foram capazes de levar a uma melhora nos batimentos cardíacos, revertendo o bloqueio átrio-ventricular que é observado na infecção crônica, e ainda favorecer ao aumento da fração de ejeção ventricular observada por eco- cardiograma.

Durante décadas acreditava-se que o coração era um órgão pós-mitótico, sem capacidade de regeneração, atualmente sabe-se que 50% dos cardiomiócitos são renovados ao longo da vida (Carvalho e de Carvalho, 2010). Os fatores de transcrição governam a maioria dos programas de expressão gênica de desenvolvimento e podem alterar completamente o estado de uma célula diferenciada (Louis e John, 2011; Marjolein et al., 2016). No coração, um grande grupo de fatores de transcrição, incluindo membros das famílias GATA, T-Box,

NKX, Islet, Mef2 e Hand, atuam controlando a expressão de gene cardíaco (Alexander e Bruneau, 2010), como os genes das células cardíacas envolvidos na contração e na morfologia, contribuindo para a cardiogênese (Olson, 2006). Já foi relatado que a combinação específica de três fatores de transcrição (GATA, Mef2c e Tbox-5) foi suficiente para gerar cardiomiócitos funcionalmente contráteis, que foram reprogramados para adotar um perfil de expressão de genes tipo cardiomiócitos (Ieda et al., 2010). Alguns destes fatores de transcrição são comumente utilizados como marcadores de regeneração cardíaca, estes marcadores selecionados possibilitariam a observação da diferenciação para linhagem de cardiomiócitos recentes (Zamilpa et al., 2014).

No presente estudo, demonstramos que a infecção crônica provoca queda da expressão de todos os marcadores selecionados, este fato pode contribuir ainda mais para o comprometimento da funcionalidade cardíaca. Além disso, observamos também que os camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* e tratados com GW788388 três vezes por semana, durante 30 dias, apresentaram aumento na expressão de dois dos marcadores de regeneração testados, GATA-6 e Tbox-5. Tal dado indica que este esquema de tratamento foi capaz de induzir a regeneração cardíaca. Já foi demonstrado que membros da família GATA e Tbox são capazes de interagir entre si (Garg et al., 2003), e co-ativam a expressão de genes cardíacos, promovendo assim a diferenciação de cardiomiócitos (Ghosh et al., 2009).

Ifkovits et al. (2014) demonstraram que a inibição de TGF- $\beta$  leva ao aumento da conversão de fibroblasto em cardiomiócitos e na presença de TGF- $\beta$ , a taxa de conversão dos fibroblastos em cardiomiócitos é diminuída. Um outro estudo usando um modelo de lesão cardíaca do infarto do miocárdio mostrou que a inibição do receptor de TGF- $\beta$  aumentou a regeneração cardíaca e melhorou a função cardíaca (Chen et al., 2015). Esses dados demonstram que a inibição de TGF- $\beta$  apresenta potencial terapêutico em medicina cardiovascular regenerativa.

A análise da expressão proteica de Troponina T corroboraram os dados da expressão gênica observados por RT-qPCR. Troponina T é um marcador de sarcômero específico de cardiomiócitos maduros diferenciados, e apesar da diferenciação de cardiomiócitos ocorrer de forma rápida, a maturação completa é um processo lento, que ocorre ao longo de várias semanas (Ieda et al., 2010). Tal



informação pode justificar o fato de não observarmos aumento da expressão de Troponina T no coração dos animais infectados por *T. cruzi* em resposta ao tratamento com GW788388, uma vez que a análise é realizada apenas quatro semanas após o início do tratamento, e este período não seria suficiente para a maturação dos cardiomiócitos diferenciados.

Tendo em vista as considerações acima abordadas, seria interessante o acompanhamento dos animais por um período mais longo, após a interrupção do tratamento, uma vez que marcadores como a Troponina T poderiam estar aumentados posteriormente. Assim, torna-se importante estender os experimentos por mais 30 dias, chegando a 180 dpi, possibilitando acompanhar o padrão de expressão dos marcadores selecionados para avaliar se estes poderiam ser aumentados ou mantidos após este período. Além disso, seria interessante também verificar a zona do coração onde ocorre a regeneração cardíaca e ainda a localização das metaloproteases e TIMPs analisados no tecido cardíaco.

Em conjunto nossos dados demonstram que o tratamento com GW788388 reverte a fibrose cardíaca possivelmente através de um mecanismo de controle da atividade de MMP-2 e MMP-9 e regulação da expressão de TIMPs. Além disso, o tratamento no esquema de 3 vezes por semana pode contribuir para a regeneração cardíaca, favorecendo a diferenciação de novos cardiomiócitos. Dessa forma, nosso estudo demonstra que compostos que regulam a atividade de TGF- $\beta$  podem ser considerados como uma boa estratégia alternativa para o tratamento da fibrose cardíaca que contribui para a gravidade do acometimento cardíaco em cerca de 30% dos pacientes portadores da doença de Chagas crônica e, além disso, podendo ser um tratamento alternativo também para pacientes cardiopatas de outras etiologias.

## 6. CONCLUSÕES

- O tratamento com GW788388 recuperou a organização da proteína conexina-43, preservando o comprimento das placas no coração dos animais cronicamente infectados, desempenhando assim, papel protetor para a manutenção da estrutura de placas de junções comunicantes;
- A expressão de MMP-2 no coração não é modulada pela infecção crônica e nem pelo tratamento com GW788388, no entanto, estes fatores são capazes de modular a atividade desta proteína: enquanto a infecção diminui a atividade de MMP-2, o tratamento com GW788388 aumenta sua atividade; indicando que o mecanismo pelo qual o tratamento com GW788388 reverte a fibrose cardíaca envolve o aumento da atividade de MMP-2;
- A infecção crônica modula negativamente a expressão e atividade de MMP-9 no coração e o tratamento com GW788388 favorece a reversão da fibrose cardíaca, estimulando a degradação de matriz extracelular através da modulação positiva da expressão e atividade de MMP-9 no coração;
- As alterações na atividade de MMP-2 e MMP-9 frente à infecção crônica e ao tratamento com GW788388, demonstram o papel importante destas proteínas no processo de remodelamento cardíaco durante a doença de Chagas crônica;
- A expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 no coração também foram moduladas pela infecção crônica e em resposta ao tratamento com GW788388, demonstrando que TGF- $\beta$  atua no processo fibrótico cardíaco regulando a atividade das metaloproteases com a participação da modulação de expressão dos seus inibidores TIMPs;

- A reversão da fibrose cardíaca observada em resposta ao tratamento com GW788388 parece ser mediada por mecanismos dependentes da regulação e equilíbrio entre a atividade de MMP-2, MMP-9 e expressão de seus inibidores TIMPs.
- O tratamento com GW788388 no esquema três vezes por semana parece ser capaz de induzir a regeneração cardíaca por estimular a diferenciação de novos cardiomiócitos, através do aumento de fatores de transcrição GATA-6 e T-Box5;
- O esquema de tratamento com GW788388 três vezes por semana parece ser mais eficaz em relação ao esquema de uma vez por semana, tendo em vista que foi capaz de aumentar a atividade de ambas metaloproteases e reduzir a expressão de TIMPs no coração, favorecendo a reversão da fibrose e ainda induzir a regeneração cardíaca, demonstrando ser um melhor esquema de tratamento.

## 7. REFERÊNCIAS

Álvarez, J. M.; Fonseca, R.; da Silva, H. B.; Marinho, C. R. F.; Bortoluci, K. R.; Sardinha, L. R.; Epiphany, S.; D'Imperio Lima, M. R. Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. Hindawi Publishing Corporation, 2014. v. 2014, ID. 912965, 9 p.

Akazawa, H.; Komuro, I. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 2005. v. 107(2), p. 252-268.

Alexander, J. M.; Bruneau, B. G. Lessons for cardiac regeneration and repair through development. *Trends in Molecular Medicine*, 2010. v. 16(9), p. 426-434.

Amălinei, C.; Căruntu I. D.; Bălan R. A. Biology of metalloproteinases. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2007. v. 48(4), p. 323–334.

Andrade, D. V.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2014. v. 8(7): e3010.

Andrade, S. G.; Grimaud, J. A. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* – an ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1986. v. 81, p. 29-41.

Andrade, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999. v. 94, suppl. 1, p. 71-80.

Araújo-Jorge, T. C.; Waghbi, M. C.; Bailly, S.; Feige, J. J. The TGF- $\beta$  pathway as an emerging target for Chagas disease therapy. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 2012. v. 92(5), p. 613- 621.

Araújo-Jorge, T. C.; Waghbi M. C.; Hasslocher-Moreno A. M.; Xavier S. S.; Higuchi M. de L.; Keramidas M.; Bailly S.; Feige J. J. Implication of transforming growth factor- $\beta$ 1 in chagas disease cardiomyopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 2002. v. 186, p. 1823-1828.

Araújo-Jorge, T. C.; Waghbi M. C.; Soeiro Mde N.; Keramidas M.; Bailly S.; Feige J. J. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic cardiomyopathy. *Cytokine Growth Factor Review*, 2008. v. 19(5-6), p. 405-413.

Bailey, B.; Izarra, A.; Alvarez, R.; Fischer, K. M.; Cottage, C. T.; Quijada, P.; Díez-Juan, A.; Sussman, M. A. Cardiac stem cell genetic engineering using the alphaMHC promoter. *Regenerative medicine*, 2009. v. 4(6), p. 823-833.

Baker, A. H.; Edwards, D. R.; Murphy, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of Cell Science*, 2002. v. 115(19), p. 3719-3727.

Bern, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas disease. *New England Journal of Medicine*, 2011. v. 364(26), p. 2527-2534.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. Doença de Chagas Aguda: Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Guia de consulta rápida para profissionais da saúde. 2008.

Brener, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (Org.). Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. cap. 2, p. 25-31.

Brew, K.; Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta*, 2010. v. 1803(1), p. 55-71.

Bujak, M.; Frangogiannis, N. G. The role of TGF- $\beta$  signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular Research*, 2007. v. 74(2), p. 184-195.

Cançado, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2002. v. 44(1), p. 29-37.

Calvet, C. M.; Silva, T. A.; de Melo, T. G.; Araujo-Jorge, T. C.; Pereira, M. C. TGF- $\beta$  receptor type II costameric localization in cardiomyocytes and host cell TGF- $\beta$  response is disrupted by *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology*, 2016. v. 143(6), p. 704-715.

Carvalho, A. B.; de Carvalho, A. C. Heart regeneration: past, present and future. *World Journal of Cardiology*, 2010. v. 2(5), p. 107-111.

Carvalho, C. M. E.; Silverio J. C.; da Silva A. A.; Pereira I. R.; Coelho J. M.; Britto C. C.; Moreira O. C.; Marchevsky R. S.; Xavier S. S.; Gazzinelli R. T.; da Glória Bonecini-Almeida M.; Lannes-Vieira J. Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of *Trypanosoma cruzi*-infected Rhesus Monkeys: Association with heart injury. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2012. v.6(5): e1644.

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

Chan, S. S. K.; Shueh, Y. Z.; Liu, Y. W.; Hsieh, P. C. H. Harnessing endogenous intra- and extra-cardiac stem cells for cardiac regeneration – hope or hype? *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2009. v. 6(4), p. 127-133.

Chen, W. P.; Liu, Y. H.; Ho, Y. J.; Wu, S. M. Pharmacological inhibition of TGF- $\beta$  receptor improves Nkx2.5 cardiomyoblast-mediated regeneration. *Cardiovascular Research*, 2015. v. 105(1), p. 44-54.

Chen, Y. Q.; Sloan-Lancaster, J.; Berg, D. T.; Richardson, M. A.; Grinnell, B.; Tseng-Crank, J. Differential mechanisms of plasminogen activator inhibitor-1 activation by transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. *Trombosis and Haemostasis*, 2001. v. 86(6), p. 1563 – 1572.

Coura, J. R.; Borges-Pereira, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2012. v. 45(3), p. 286-296.

Coura, J. R.; De Castro, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002. v. 97(1), p. 3-24.

Coura, J. R.; Dias, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009. v. 104, suppl. 1, p. 31-40.

Coura, J. R.; Abreu, L. L. de; Willcox, H. P. F.; Petana, W. Estudo comparativo controlado com emprego de Benznidazole, Nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1997. v. 30(2), p. 139-144.

Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007. v. 102 Suppl 1:113-22.

Coura, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009. v. 104(4), p. 549-554.

Daniels, C. E.; Wilkes, M. C.; Edens, M.; Kottom, T. J.; Murphy, S. J.; Limper, A. H.; Leof, E. B. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 2004. v. 114(9), p. 1308-1316.

de Oliveira, F. L.; Araújo-Jorge T. C.; de Souza E. M.; de Oliveira G. M.; Degraive W. M.; Feige J. J.; Bailly S.; Waghbi M. C. Oral Administration of GW788388, an Inhibitor of Transforming Growth Factor Beta Signaling, Prevents Heart Fibrosis in Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 2012. v. 6(6): e1696.

de Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, 2002. v. 8(4), p. 269-85.

Dias, J. C. P. A doença de Chagas e seu controle na América Latina. Uma análise de possibilidades. *Cadernos de saúde pública*, 1993. v. 9(2), p. 201-209.

Dias, J. C. P.; Neto, V. A.; Luna, E. J. A. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2011. v. 44(3), p. 375-379.

Dias, J. C. P.; Neto, V. A. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2011. v. 44, suppl. 2, p. 68-72.

Días de Toranzo, E. G.; Castro J. A.; Franke de Cazzulo B. M.; Cazzulo J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 1988. v. 44(10), p. 880-881.

Dobaczewski, M.; Chen, W.; Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2011. v. 51(4), p. 600-606.

Dong, C.; Zhu, S.; Wang, T.; Yoon, W.; Goldschmidt-Clermont, P. J. Upregulation of PAI-1 is mediated through TGF- $\beta$ /Smad pathway in transplant arteriopathy. *Journal of Heart and lung transplantation*, 2002. v. 21(9), p. 999 – 1008.

Eghbali, M.; Tomek, R.; Sukhatme, V. P.; Woods, C.; Bhambi, B. Differential effects of transforming growth factor- $\beta$  1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circulation Research*, 1991. v. 69(2), p. 483-490.

Eschenhagen, T.; Bolli, R.; Braun, T.; Field, L. J.; Fleischmann, B. K.; Frisén, J.; Giacca, M.; Hare, J. M.; Houser, S.; Lee, R. T.; Marbán, E.; Martin, J. F.; Molkenkin, J. D.; Murry, C. E.; Riley, P. R.; Ruiz-Lozano, P.; Sadek, H. A.; Sussman, M. A.; Hill, J. A. Cardiomyocyte regeneration: a consensus statement. *Circulation*, 2017. v. 136(7), p. 680-686.

Fares, R. C.; Gomes, J. de A.; Garzoni, L. R.; Waghbi, M. C.; Saraiva, R. M.; Medeiros, N. I.; Oliveira-Prado, R.; Sengenis, L. H.; Chambela, Mda C.; de Araújo, F. F.; Teixeira-Carvalho, A.; Damásio, M. P.; Valente, V. A.; Ferreira, K. S.; Sousa, G.R.; Rocha, M. O.; Correa-Oliveira, R. 2013. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. *Infect Immun*. 81(10):3600-8.

Ferrão, P. M.; d'Avila-Levy, C. M.; Araujo-Jorge, T. C.; Degraive, W. M.; Gonçalves Ada, S.; Garzoni, L. R.; Lima, A. P.; Feige, J. J.; Bailly, S.; Mendonça-Lima, L.; Waghbi, M. C. Cruzipain Activates Latent TGF- $\beta$  from Host Cells during *T. cruzi* Invasion. *PLoS ONE*, 2015. v. 10(5): e0124832.

Ferreira, I. L. M.; Silva, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2006. v. 39(5), p. 507-509.

Ferreira-Martins, J.; Ogorék, B.; Cappetta, D.; Matsuda, A.; Signore, S.; D'Amaro, D.; Kostyla, J.; Steadman, E.; Ide-Iwata, N.; Sanada, F.; Iaffaldano, G.; Ottolenghi, S.; Hosoda, T.; Leri, A.; Kajstura, J.; Anversa, P.; Rota, M. Cardiomyogenesis in the developing heart is regulated by c-kit-positive cardiac stem cells. *Circulation research*, 2012. v. 110(5), p. 701-715.

Ferreira, R. R.; de Souza E. M.; de Oliveira F. L.; Ferrão P. M.; Gomes L. H.; Mendonça-Lima L.; Meuser-Batista M.; Bailly s.; Feige J. J.; de Araujo-Jorge T. C.; Waghbi M. C. Proteins involved on TGF- $\beta$  pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology*, 2016. v. 221(5), p. 587-594.

Folgueras A. R.; Pendás A. M.; Sánchez L. M.; López-otín C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *International Journal Developmental Biology*, 2004. v. 48, p. 411–424.

Franco, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina, Ribeirão Preto, 2001. v. 34, p. 229-237.

Frolik, C. A.; Dart, L. L.; Meyers C. A.; Smith, D. M.; Sporn M. B. Purification and initial characterization of a type  $\beta$  transforming growth factor from human placenta. Proc. Natl. Acad. Sci., 1983. v. 80, p. 3676-3680.

Fu, K. Corbley, M. J.; Sun, L.; Friedman, J. E.; Shan, F.; Papadatos, J. L.; Costa, D.; Lutterodt, F.; Sweigard, H.; Bowes, S.; Choi, M.; Boriack-Sjodin, P. A.; Arduini, R. M.; Sun, D.; Newman, M. N.; Zhang, X.; Mead J. N.; Chuaqui, C. E.; Cheung, H.K.; Zhang, X.; Cornebise, M.; Carter, M. B.; Josiah, S.; Singh, J.; Lee, W. C.; Gill, A.; Ling, L. E. SM16, an Orally Active TGF- $\beta$  Type I Receptor Inhibitor Prevents Myofibroblast Induction and Vascular Fibrosis in the Rat Carotid Injury Model. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2008. v. 28, p. 665-671.

Gaita, F.; Giustetto, C.; Bianchi, F.; Wolpert C.; Schimpf, R.; Riccardi, R.; Grossi, S.; Richiardi, E.; Borggreffe, M. Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. Circulation, 2003. v. 108, p. 965-970.

Gattazzo, F.; Urciuolo, A.; Bonaldo, P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche, Biochimica et biophysica acta, 2014. v. 1840(8), p. 2506-2519.

Garg, V.; Kathiriya, I. S.; Barnes, R.; Schluterman, M. K.; King, I. N.; Butler, C. A.; Rothrock, C. R.; Eapen, R. S.; Hirayama-Yamada, K.; Joo, K.; Matsuoka, R.; Cohen, J. C.; Srivastava, D. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. Nature, 2003. v. 424, p. 443-447.

Gellibert, F.; de Gouville, A. C.; Woolven, J.; Mathews, N.; Nguyen, V. L.; Bertho-Ruault, C.; Patikis, A.; Grygielko, E. T.; Laping, N. J.; Huet, S. Discovery of 4-{4-[3-(pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]pyridin-2-yl}-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)benzamide (GW788388): a potent, selective, and orally active transforming growth factor-beta type I receptor inhibitor. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. v. 49(7), p. 2210-2221.

Geurts, N.; Opdenakker, G.; Van den Steen, P. E. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. Pharmacology & Therapeutics, 2011. v. 133(3), p. 257-279.

Ghosh, T. K.; Song, F. F.; Packham, E. A.; Buxton, S.; Robinson, T. E.; Ronksley, J.; Self, T.; Bonser, A. J.; Brook, J. D. Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. Molecular Cellular Biology, 2009. v. 29, p. 2205-2218.

Han, Y. P.; Tuan T. L.; Hughes M.; Wu H.; Garner W. L. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. The Journal of Biological Chemistry, 2001. v. 276(25), p. 22341-22350.



Hatzistergos, K. E.; Quevedo, H.; Oskouei, B. N.; Hu, Q.; Feigenbaum, G. S.; Margitich, I. S.; Mazhari, R.; Boyle, A. J.; Zambrano, J. P.; Rodriguez, J. E.; Dulce, R.; Pattany, P. M.; Valdés, D.; Revilla, C.; Heldman, A. W.; McNiece, I.; Hare, J. M. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circulation research*, 2010. v. 107(7), p. 913-922.

Hernández, C.; Cucunubá, Z.; Parra, E.; Toro, G.; Zambrano, P.; Ramirez, J. D. Chagas disease (*Trypanossoma cruzi*) and HIV co-infection in Colombia. *International Journal of Infectious Diseases*, 2014. v. 26, p. 146-148.

Hernández, C.; Salazar, C.; Brochero, H.; Teherán, A.; Buitrago, L. S.; Vera, M.; Soto, H.; Florez-Rivadeneira, Z.; Ardila, S.; Parra-Henao, G.; Ramirez, J. D. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasites & Vectors*, 2016b. v. 9, p. 620.

Hernández, C.; Vera, M. J.; Cucunubá, Z.; Flórez, C.; Cantillo, O.; Buitrago, L. S.; González, M. S.; Ardila, S.; Dueñas, L. Z.; Tovar, R.; Forrero, L. F.; Ramirez, J. D. High-Resolution Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in 2 Large Outbreaks of Acute Chagas Disease in Colombia. *The Journal of Infectious Disease*, 2016a. v. 214(8), p. 1252-1255.

Higuchi, M. L.; De Brito, T.; Martins Reis, M.; Barbosa, A.; Bellotti, G.; Pereira-Barreto, A. C.; Pileggi, F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic Chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovascular Pathology*, 1993. v. 2, p. 101-106.

Hurst IV, V.; Goldberg P.L.; Minnear F. L.; Heimark R. L.; Vincent P. A. Rearrangement of adherens junctions by transforming growth factor- $\beta$ 1: role of contraction. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1999. v. 276(4), p. L582-L595.

Ieda, M.; Fu, J. D.; Delgado-Olguin, P.; Vedantham, V.; Hayashi, Y.; Bruneau, B. G.; Srivastava, D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010. v. 142(3), p. 375-386.

Ifkovits, J. L.; Addis R. C.; Epstein J.A.; Gearhart J.D. Inhibition of TGF $\beta$  Signaling Increases Direct Conversion of Fibroblasts to Induced Cardiomyocytes. *PLoS ONE*, 2014. v. 9(2): e89678.

Ignatz, R. A.; Massagué, J. Transforming Growth Factor- $\beta$  Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 1986. v. 261(9), p. 4337-4345.

Ihn, H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- $\beta$  and CTGF. *Current Opinion in Rheumatology*, 2002. v. 14(6), p. 681-685.

Khalil, N. TGF- $\beta$ : from latent to active. *Microbes and Infection*, 1999. v. 1(15), p.1255- 1263.

Kehrl, J. H.; Wakefield, L. M.; Roberts, A. B.; Jakowlew, S.; Alvarez Mon, M.; Derynch, R.; Sporn, M. B.; Fauci, A. S. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potencial role in the regulation of T cell growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 1986. v. 163(5), p. 1037-1050.

Kisseleva, T.; Brenner, D. A. Mechanisms of fibrogenesis. *Experimental biology and medicine*. 2008. v. 233(2), p. 109-122.

Kimura, E. T.; Matsuo, S. E.; Ricarte-Filho, J. C. TGF- $\beta$ , activin and SMAD signalling in thyroid cancer. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2007. v. 51(5), p. 683-689.

Koli, K.; Saharinen, J.; Hyytiäinen, M.; Penttinen, C.; Keski-Oja, J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microscopy Research and Technique*, 2001. v. 52(4), p. 354-362.

Kutz, S. M.; Hordines, J.; McKeown-Longo, P. J.; Higgins, P. J. TGF- $\beta$  induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion. *Journal of Cell Science*, 2001. v. 114, p. 3905 – 3914.

Lawrence, D. A. Latent-TGF-beta: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001. v. 219, p. 163-170.

Lee, E.; Vaughan D. E.; Parikh S. H.; Grodzinsky A. J.; Libby P.; Lark M. W.; Lee, R. T. Regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by plasminogen in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 1996. v. 78(1), p. 44-49.

Leong, Y. Y.; Ng, W. H.; Ellison-Hughes, G. M.; Tan, J. J. Células-tronco cardíacas para regeneração miocárdica: elas não estão sozinhas. *Fronteiras em Medicina Cardiovascular*, 2017. v. 4:47.

Leri, A.; Kajstura, J.; Anversa, P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiological Reviews*, 2005. v. 85(4), p. 1373-1416.

Lijnen, H. R. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Moscow)*, 2002. v. 67(1), p. 92-98.

Li, T. S.; Suzuki, R.; Ueda, K.; Murata, T.; Hamano, K. Analysis of the origin and population dynamics of cardiac progenitor cells in a donor heart model. *Stem cells*, 2007. v. 25(4), p. 911-917.

Liu, J. X.; Ruan, C. M.; Gong, X. F.; Li, X. Z.; Wang, H. L.; Wang, M. W.; Yin, J. Q. Antagonism of transforming growth factor-beta signaling inhibits fibrosis-related genes. *Biotechnology Letters*, 2005. v. 27, p. 1609-1615.

López-Casillas, F.; Wrana, J. L.; Massagué, J. Betaglycan presents ligand to the TGF- $\beta$  signaling receptor. *Cell*, 1993. v. 73(7), p. 1435-1444.

Doré, L. C.; Crispino, J. D. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood*, 2011. v. 118(2), p. 231–239.

- Macêdo, V. Indeterminate Form of Chagas Disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999. v. 94, Suppl. 1, p. 311-316.
- Mannello, F.; Medda, V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2012. v. 47, p. 27-58.
- Marjolein, H. F. M. L.; Hanneke, E. C. N.; Yoshimitsu, A.; Adriaan, P. B.; Veerle, M.; Manon van, E. D. The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Reviews Molecular Medicine*, 2016. v. 18, e3.
- Martin, J.; Kelly, D. J.; Mifsud, S. A.; Zhang, Y.; Cox, A. J.; See, F.; Krum, H.; Wilkinson-Berka, J.; Gilbert, R. E. Tranilast attenuates cardiac matrix deposition in experimental diabetes: role of transforming growth factor- $\beta$ . *Cardiovascular Research*, 2005. v.65, p. 694-701.
- Massagué, J.; Blain, S. W.; Lo, R. S. TGF- $\beta$  Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*, 2000. v. 103(2), p. 295-309.
- Massagué J. Epidermal Growth Factor-like Transforming Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 1983. v. 258(22), p. 13614-13620.
- Massagué, J. TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 1998. v. 67, p. 753-791.
- Masseno, A. P. B.; Porto C. D.; Nunes L. C.; Sequeira J. L.; Alvarenga M. A. Miofibroblastos: Revisão de Literatura. *Veterinária e Zootecnia*, 2010. v. 17(2), p. 177-190.
- McDonnell, S.; Matrisian, L. M. Stromelysin in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 1990. v. 9(4), p. 305–319.
- Medeiros, N. G.; Gomes, J. A. S.; Fares, R. C. G. A importância das metaloproteinases no remodelamento do miocárdio. *Pós em revista*, 2012. v. 6.
- Ming, M.; Ewen, M. E.; Pereira, M. E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF-  $\beta$  signaling pathway. *Cell*, 1995. v. 82(2), p. 287-296.
- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009. v. 104 Suppl 1:17-30.
- Morillo, C. A.; Marin-Neto, J. A.; Avezum, A.; Sosa-Estani, S.; Rassi Jr, A.; Rosas, F. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal Medicine*, 2015. v. 373 (14), p. 1295-1306.
- Moustakas, A.; Heldin, C. H. Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Letters*, 2008. v. 582(14), p. 2051-2065.
- Moustakas, A.; Heldin, C. H. Non-Smad TGF- $\beta$  signals. *Journal of Cell Science*, 2005. v. 118, p. 3573-3584.

Muñoz-Saravia, S.G.; Haberland, A.; Wallukat, G.; Schimke, I. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*, 2010. v. 17(1), p. 45-64.

Muñoz-Saravia, S.G.; Haberland, A.; Wallukat, G.; Schimke, I. Chronic Chagas' heart disease – From pathogenesis to treatment regimes. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*, 2012. v. 16, p. 55-81.

Nóbrega, A. A.; Garcia, M. H.; Tatto, E.; Obara, M. T.; Costa, E.; Sobel, J.; Araujo W. N. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2009. v. 15(4), p. 663-665.

Okada, H.; Takemura, G.; Kosai, K.; Li, Y.; Takahashi, T.; Esaki, M.; Yuge, K.; Miyata, S.; Maruyama R.; Mikami, A.; Minatoguchi, S.; Fujiwara, T.; Fujiwara, H. Postinfarction gene therapy against transforming growth factor-beta signal modulates infarct tissue dynamics and attenuates left ventricular remodeling and heart failure. *Circulation*, 2005. v. 111(19), p. 2430-2437.

Olson, E. N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*, 2006. v. 313(5795), p. 1922-1927.

Opdenakker, G.; Van den Steen P. E.; Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends in Immunology*, 2001. v. 22(10), p. 571-579.

Organização Mundial da Saúde. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 22 março. 2017.

Parks, W. C.; Wilson, C. L.; Lopez-Boado, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2004. v. 4, p. 617-629.

Pawani, H.; Bhartiya, D. Pluripotent stem cells for cardiac regeneration: overview of recent advances & emerging trends. *Indian Journal of Medical Research*, 2013. v. 137(2), p. 270-282.

Pereira, I.R.; Vilar-Pereira, G.; Moreira, O. C.; Ramos, I. P.; Gibaldi, D.; Britto, C.; Moraes, M. O.; Lannes-Vieira, J. Pentoxifylline reverses chronic experimental Chagasic cardiomyopathy in association with repositioning of abnormal CD8+ T-cell response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2015. v. 19; 9(3):e0003659.

Pereira, I. R.; Vilar-Pereira, G.; Silva, A. A.; Lannes-Vieira J. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2014. v. 109(3), p. 289-298.

Peters, N. S.; Green C. R.; Poole-Wilson P. A.; Severs N. J. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*, 1993. v. 88, p. 864-875.

Petersen, M. Thorikay, M.; Deckers. M.; van Dinther, M.; Grygielko E. T.; Gellibert, F.; de Gouville, A. C.; Huet,S.; ten Dijke, P.; Laping, N. J. Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney International*, 2008. v. 73, p. 705-715.

Piek, E.; Heldin, C.H.; Ten Dijke, P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB Journal*, 1999. v. 13(15), p. 2105-2124.

Pikkarainen, S.; Tokola, H.; Kerkelä, R.; Ruskoaho, H. GATA transcription factors in the developing and adult heart, *Cardiovascular research*, 2004. v. 63(2), p. 196-207.

Polyakova, V.; Loeffler, I.; Hein, S.; Miyagawa, S.; Piotrowska, I.; Dammer, S.; Risteli, J.; Schaper, J.; Kostin, S. Fibrosis in endstage human heart failure: Severe changes in collagens metabolism and MMP/TIMP profiles. *International Journal of Cardiology*, 2010. v. 151(1), p. 18-33.

Prata, A.; Macêdo, V.; Porto, G.; Santos, I.; Cerisola, J. A.; Silva, N. Tratamento da Doença de Chagas pelo Nifurtimox (Bayer 2502). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, 1975. v.9( 6 ): 297-307.

Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J.A. Chagas disease. *Lancet*, 2010. v. 375(9723), p. 1388-1402.

Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J.A.. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009. v. 104, suppl. 1, p. 152-158.

Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Rezende, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease)., *Infectious Disease Clinics of North America* 2012. v. 26(2), p. 275-291.

Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Little, W. C. Chagas' heart disease. *Clinical cardiology*, 2000. v. 23(12), p. 883-889.

Reisdorf, P.; Lawrence, D. A.; Sivan, V.; Klising, E.; Martin, M. T. Alteration of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Response Involves Down-Regulation of Smad3 Signaling in Myofibroblasts from Skin Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 2001. v. 159(1), p. 263-272.

Roberts, A. B.; Anzano, M. A.; Lamb, L. C.; Smith, J. M.; Frolik, C. A.; Marquardt, H.; Todaro, G. J.; Sporn, M. B. Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF. *Nature*, 1982. v. 295, p. 417-419.

Rossi, M. A.; Ramos, S. G. Pathogenesis of Chronic Chagas' Myocarditis: An Overview. *Cardiovascular Pathology*, 1996. v. 5(4), p. 197-202.

Rossi, M. A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *International Journal of Cardiology*, 1998. v. 66(2), p. 183-194.

Rossi, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, 1991. v. 30(3), p. 335-340.

Saharinen, J.; Hyytiäinen, M.; Taipale, J.; Keski-Oja J. Latent transforming growth factor- $\beta$  binding proteins (LTBPs) - structural extracellular matrix proteins for targeting TGF- $\beta$  action. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 1999. v. 10(2), p. 99-117.

Samudio, M.; Montenegro-James, S.; Kasamatsu, E.; Cabral, M.; Schinini, A.; Rojas De Arias, A.; James, M. A. Local and systemic cytokine expression during experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in a Cebus monkey model. *Parasite Immunology*, 1999. v. 21(9), p. 451-460.

Saraiva, R. M.; Waghabi, M. C.; Vilela, M. F.; Madeira, F. S.; Sperandio da Silva, G. M.; Xavier, S. S.; Feige, J. J.; Hasslocher-Moreno, A. M.; Araujo-Jorge, T. C. Predictive value of transforming growth factor- $\beta$ 1 in Chagas disease: towards a biomarker surrogate of clinical outcome. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2013. v. 107, p. 518-525.

Schiller, M.; Javelaud, D.; Mauviel, A. TGF- $\beta$ -induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 2004. v. 35(2), p. 83-92.

Schmunis, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2007. v. 102, suppl. 1, p. 75-85.

Shiojima, I.; Komuro, I. Cardiac developmental biology: from flies to humans. *The Japanese journal of physiology*, 2005. v. 55(5), p. 245-254.

Silva, J. S.; Twardzik, D. R.; Reed, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infections *in vitro* and *in vivo* by Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *Journal of Experimental Medicine*, 1991. v. 174, p. 539-545.

Silverio, J. C.; de-Oliveira-Pinto, L. M.; da Silva, A. A.; de Oliveira, G. M.; Lannes-Vieira J. Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *International Journal of Experimental Pathology*, 2010. v. 91(1), p. 72-86.

Silverio, J. C.; Pereira, I. R.; Cipitelli, M. C.; Vinagre, N. F.; Rodrigues, M. M.; Gazzinelli, R. T.; Lannes-Vieira, J. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathogens*, 2012. v. 8: e1002645.

Souza, A. P. de; Line, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev. FOB*, 2002. v. 10, n.1, p. 1-6.

Spinale, F. G.; Coker, M. L.; Bond, B. R.; Zellner, J. L. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovascular Research*, 2000. v. 46(2), p.225-238.

Spinale, F. G. Myocardial matrix remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiological Reviews*, 2007. v. 87(4), p. 1285-1342.

Spray, D. C.; Burt, J. M. Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *American Journal of Physiology*, 1990. v. 258 (2):C195-205.

Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastases. *Cancer Biology*, 2000. v. 10(6), p. 415-433.

Steverding, D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*, 2014. v.7 (317), p. 1-8.

Tan, S. M. Zhang, Y.; Connelly, K. A.; Gilbert, R. E.; Kelly, D. J. Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2010. v. 298(5), p. H1415- H1425.

Tang, J.; Wang, J.; Kong, X.; Yang, J.; Guo, G.; Zheng, M.; Zhang, L.; Huang, Y.; Wan, Y. Vascular endothelial growth factor promotes cardiac stem cell migration via the PI3K/Akt pathway. *Experimental cell research*, 2009. v. 315(20), p. 3521 - 3531.

Tanowitz, H. B.; Machado, F. S.; Jelicks, L. A.; Shirani, J.; de Carvalho, A. C.; Spray, D. C.; Factor, S. M.; Kirchhoff, L. V.; Weiss, L. M. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Progress in cardiovascular diseases*, 2009. v. 51(6), p. 524-539.

Teixeira, A. R.; Nitz, N.; Guimaro, M. C.; Gomes, C.; Santos-Buch, C. A. Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal*, 2006. v. 82(974), p. 788-798.

Todorovic, V. Jurukovski, V.; Chen, Y.; Fontana, L.; Dabovic, B.; Rifkin, D. B. Latent TGF- $\beta$  binding proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005. v. 37(1), p. 38-41.

Vanneaux, V.; Farge-Bancel, D.; Lecourt, S.; Baraut, J.; Cras, A.; Jean-Louis, F.; Brun, C.; Verrecchia, F.; Larghero, J.; Michel, L. Expression of transforming growth factor  $\beta$  receptor II in mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *BMJ Open*, 2013. v. 3(1), e001890.

van Wijk, B.; Moorman, A. F. M; Van Den Hoff, M. J. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovascular research*, 2007. v. 74(2), p. 244-255.

Verrecchia, F.; Mauviel, A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 2007. v. 13(22), p. 3056-3062.

Waghbi, M. C.; Keramidas M.; Feige J. J.; Araujo-Jorge T. C.; Bailly S. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Microbiology*, 2005. v. 7(4), p. 511-517.

Waghbi, M. C.; Coutinho-Silva R.; Feige J. J.; Higuchi M. de L.; Becker D.; Burnstock G.; AraújoJorge T. C. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor-beta treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009a. v. 104(8), p. 1083-1090.

Waghabi, M. C.; Coutinho, C. M.; Soeiro, M. N.; Pereira, M. C.; Feige, J. J.; Keramidas, M.; Cosson, A.; Minoprio, P.; Van Leuven, F.; Araújo-Jorge, T. C. Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin. *Infection and Immunity*, 2002. v. 70, p. 5115-5123.

Waghabi, M. C.; Souza E. M.; Oliveira G. M.; Keramidas M.; Feige J. J.; Araújo-Jorge T. C.; Bailly S. Pharmacological inhibition of Transforming Growth Factor beta signalling decreases infection and prevents heart damage in Acute Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009. v. 53(11), p. 4694-4701.

Waghabi, M. C.; Keramidas M.; Calvet C.; Meuser M.; Soeiro M. N. C.; Mendonça-Lima L.; Araújo-Jorge T.C.; Feige J. J.; Bailly, S. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007. v. 51(8), p. 2905-2910.

Waghabi, M. C.; Keramidas, M.; Bailly, S.; Degraeve, W.; Mendonça-Lima, L.; Soeiro, Mde N.; Meirelles, Mde N.; Paciornik, S.; Araújo-Jorge, T. C.; Feige, J. J. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *American Journal of Pathology*, 2005. v. 167(4), p. 993-1003.

Wang, K.; Zhao, X.; Kuang, C.; Qian, D.; Wang, H.; Jiang, H.; Deng, M.; Huang, L. Overexpression of SDF-1 $\alpha$  enhanced migration and engraftment of cardiac stem cells and reduced infarcted size via CXCR4/PI3K pathway. *PloS one*, 2012. v. 7(9), p. e43922.

Wang, S.; Wilkes, M. C.; Leof, E. B.; Hirschberg, R. Imatinib mesylate blocks a non-smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *Faseb Journal*, 2005. v. 19(1), p. 1-11.

Woods, L. T.; Camden, J. M.; El-Sayed, F. G.; Khalafalla, M. G.; Petris, M. J.; Erb, L.; Weisman, G. A. Increased Expression of TGF- $\beta$  Signaling Components in a Mouse Model of Fibrosis Induced by Submandibular Gland Duct Ligation. *PLoS ONE*, 2015. v. 10(5): e0123641.

Yuan, W.; Varga, J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001. v. 276(42), p. 3850238510.

Yu, Q.; Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes e Development*, 2000. v. 14(2), p. 163-176.

Zamilpa, R.; Navarro M. M.; Flores I.; Griffey S. Stem cell mechanisms during left ventricular remodeling post-myocardial infarction: Repair and regeneration. *World Journal of Cardiology*, 2014. v. 6(7), p. 610-620.



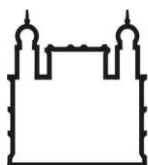
Zhang, N.; Mustin, D.; Reardon, W.; Almeida, A. D.; Mozdziak, P.; Mrug, M.; Eisenberg, L. M.; Sedmera, D. Blood-borne stem cells differentiate into vascular and cardiac lineages during normal development. *Stem cells and development*, 2006. v. 15(1), p. 17-28.

Zhang, X.; Wu, D.; Choi, J. C.; Minard, C. G.; Hou, X.; Coselli, J. S.; Shen, Y. H.; LeMaire, S. A. Matrix metalloproteinase levels in chronic thoracic aortic dissection. *Journal Surgical Research*, 2014. v. 189(2), p. 348-358.

Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A. G.; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009. v. 104(7), p. 1051-1054.

Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; Andrade, S. G.; Sturm, N. R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012. v. 12(2), p. 240-253.

## ANEXO



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética  
no Uso de Animais**

**LW-42/11**

## LICENÇA

**Certificamos que o protocolo (P-45/11-6), intitulado "Inovações terapêuticas para o tratamento da fibrose cardíaca na doença de Chagas experimental através da inibição de TGF- $\beta$ ", sob a responsabilidade de MARIANA CALDAS WAGHABI, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade**

**Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.**

**Esta licença tem validade até 28/11/2015 e inclui o uso total de :**

### ***Mus musculus***

- 500 Machos de Swiss Webster, Peso: 12,0000 Grama(s).
- 300 Fêmeas de Swiss Webster, Peso: 12,0000 Grama(s).

### ***Mus musculus***

- 500 Fêmeas de C57BL/6, Peso: 12,0000 Grama(s).

### ***Mus musculus***

- 500 Machos de BALB/c An, Peso: 12,0000 Grama(s).

**Rio de Janeiro, 28 de novembro de 2011**

**Octavio Augusto França**  
**Presgrave Coordenador da CEUA**

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br