

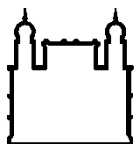
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**PAPEL DE QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) NA
HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA POR *Trypanosoma cruzi***

AMANDA RESENDE TUCCI

Rio de Janeiro
Janeiro/ 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AMANDA RESENDE TUCCI

Papel de quinase de adesão focal (FAK) na hipertrofia cardíaca induzida por
Trypanosoma cruzi

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Ciências (Biologia Parasitária)

Orientadora: Dra. Mirian Cláudia de Souza Pereira

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2021

Tucci, Amanda Resende.

Papel de quinase de adesão focal (FAK) na hipertrofia cardíaca induzida por *Trypanosoma cruzi* / Amanda Resende Tucci. - Rio de Janeiro, 2021.
110 f.

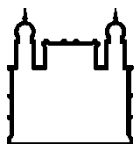
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientadora: Mirian Claudia de Souza Pereira.

Bibliografia: f. 70-93

1. Quinase de adesão focal. 2. *Trypanosoma cruzi* . 3. Hipertrofia cardíaca. 4. Fibrose cardíaca. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AMANDA RESENDE TUCCI

Papel de quinase de adesão focal (FAK) na hipertrofia cardíaca induzida por
Trypanosoma cruzi

ORIENTADORA: Dra Mirian Claudia de Souza Pereira

Aprovada em: 12/01/2021

EXAMINADORAS:

Prof. Dra. Andrea Henriques Pons - **Presidente** (IOC, FIOCRUZ)

Prof. Dra. Katia da Silva Calabrese (IOC, FIOCRUZ)

Prof. Dra. Claudia dos Santos Mermelstein (UFRJ, RJ)

Prof. Dra. Jacenir Santos Mallet (IOC, FIOCRUZ)

Prof. Dra. Francisca Hildemagna Guedes da Silva (UFRJ/ RJ)

Rio de Janeiro, 12 de janeiro de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Amanda Resende Tucci**, sob orientação da Dr^a. Mirian Cláudia de Souza Pereira. Ao décimo segundo dia do mês de janeiro de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **"Papel de quinase de adesão focal (FAK) na hipertrofia cardíaca induzida por *Trypanosoma cruzi*"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia Celular e Ultra-Estrutura de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Andrea Henriques Pons – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Katia da Silva Calabrese– IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Cláudia dos Santos Mermelstein – UFRJ/RJ, e como suplentes: Dr^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet-IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Francisca Hildemagna Guedes da Silva - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 12 de janeiro de 2021.

Dr^a. Andrea Henriques Pons (Presidente da Banca):

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao apoio, ensinamentos e afeto da minha mãe e meu pai (*in memoriam*) que me impulsionaram a ser uma pessoa melhor e correr atrás dos meus objetivos, tornando assim tudo mais valioso. Sou grata também aos meus irmãos Erika, Luiz e Bruno por terem me ajudado nos momentos de dificuldade e por terem investido em mim, quando nossos pais não tinham condições financeiras de fazer isso por nós. Amo todos vocês, simplesmente por tê-los ao meu lado!

Aos meus sobrinhos Matheus, Guilherme e Maria Clara por alegrarem meus dias e por despertarem em mim a maior sensibilidade e o mais lindo amor! E aos meus familiares pela união e torcida de sempre!

À equipe do LUC pelo apoio não apenas para seguir com essa tese, mas também por estarem ao meu lado nesses 10 anos de estudo, trabalho, aprendizado e muito desespero. Agradeço às técnicas Dayse e Renata e aos pesquisadores Tatiana Galvão e Victor. Reforçando sempre minha gratidão à Taty por ter me escolhido como sua aluna de iniciação científica e por ter contribuído com o início da minha formação. E aos técnicos, Liliane e Alanderson, os quais quis citar por último só para evidenciar o quanto vocês foram fundamentais para o desenvolvimento dos meus ensaios *in vivo* e, que tê-los nessa etapa foi muito importante para mim. Também agradeço as minhas alunas Ana Carolina e Vitória por terem me ajudado nos experimentos e me ensinado a orientar. E ao amigo Leonardo Lara pela ajuda e pelos momentos divertidos no laboratório.

Agradeço também às amigas de bancada Tatiana, por ter estado nessa caminhada comigo desde o IC e por ter sido minha dupla por tanto tempo no laboratório. Assim como Lorraine, que esteve ao meu lado nesse final, por ter me ajudado e me ouvido nos momentos de desespero. Tati, Lolo e Lili são amigas pra vida e estarão sempre no meu coração!

Ao grande amigo Perony Nogueira sou grata pela amizade, incentivo, pela ajuda diária mesmo à distância e por ser um presentinho que a Fiocruz me deu! E a todos que passaram pela minha vida nesses 10 anos de IOC e contribuíram

com minha formação profissional e pessoal. Certamente muitos foram e continuam sendo importantes, e levarei comigo de alguma forma.

Ao colaborador e colega de bancada Guilherme Lechuga, por todo apoio! Sua participação foi essencial nesse trabalho! Agradeço de coração por toda contribuição e disponibilidade.

Ao colaborador Dr. Otacilio Moreira por todo suporte e ajuda para a realização e análise da RT-qPCR. À Dr. Constança Britto por ter aberto as portas do LABIMDOE, assim como toda equipe por ter sido muito receptiva. E um agradecimento muito especial à Priscila Farani que me acompanhou nos experimentos e me ensinou com toda paciência do mundo. Agradeço também à Paula, Nathalia e Beatriz por terem me socorrido nesse final!

Ao Dr. Gabriel Oliveira pela colaboração e auxílio na análise eletrocardiográfica.

Ao Francisco por ter me coorientado nos anos iniciais do doutorado, por ter embarcado nesse projeto comigo e por ter me ajudado inúmeras vezes. Admiro sua competência e agradeço por ter me ensinado tanto!

À minha orientadora Mirian Pereira por ter sido muito presente, ter me ensinado e incentivado sempre. Sou grata por todo auxílio e, principalmente, por ter me ajudado nessa etapa final quando eu precisei muito de direcionamento e calma. Agradeço imensamente por todo apoio! Admiro a profissional e a pessoa humana que você é. Obrigada por tudo!

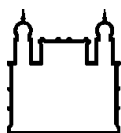
Ao Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, por todo suporte que me foi dado nesses quatro anos.

Aos membros da banca pela gentileza de aceitarem o convite e pelas contribuições feitas neste estudo.

À Capes, CNPq e FAPERJ por todo o auxílio científico, financeiro e material.

"O sucesso não tem a ver com quanto dinheiro você ganha, mas com a diferença que você faz na vida de outras pessoas".

Michelle Obama



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

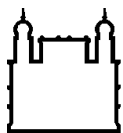
PAPEL DE QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) NA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA POR *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Amanda Resende Tucci

A doença de Chagas (DC) é a principal causa de insuficiência cardíaca em áreas endêmicas da América Latina. Hipertrofia e fibrose cardíaca estão entre as principais características da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). Portanto, o conhecimento de vias de sinalização atuantes na hipertrofia chagásica é essencial para a identificação de alvos terapêuticos. A quinase de adesão focal (FAK), uma proteína tirosina quinase não receptora, emergiu como uma via de sinalização que regula a hipertrofia cardíaca idiopática. A ativação de FAK, via resíduo de Serina 910 (S-910), por endotelina 1 (ET-1), um vasoconstritor produzido por células endoteliais, cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, desempenha um papel importante na CCC. Assim, neste estudo foi analisada a participação de FAK na modulação de hipertrofia induzida por *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *T. cruzi* (cepa Brasil) e avaliados quanto às anormalidades eletrocardiográficas (ECG) e ativação de vias de sinalização envolvidas na hipertrofia cardíaca, incluindo FAK e proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2). Além disso, a expressão do gene marcador de hipertrofia, peptídeo natriurético atrial (ANP), e componentes de matriz extracelular, como fibronectina (FN) e colágeno 1 (COL 1), foram avaliados por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e imuno-histoquímica, respectivamente, nos diferentes estágios de infecção (60 a 210 dias pós infecção (dpi)). A incidência de arritmias cardíacas foi reportada nas fases aguda e crônica da infecção experimental por *T. cruzi*. Prolongamento significativo do intervalo PR, bem como redução da frequência cardíaca foram compatíveis com a presença de bloqueio atrioventricular (BAV) e bradicardia (BRA), proeminentes entre 150 e 180 dpi, evidenciados na análise do ECG. Alterações no ECG também foram acompanhadas por elevada expressão de ANP no tecido cardíaco na fase crônica de infecção (150 a 210 dpi) e por aumento da expressão de FN e COL1. A análise da cinética de infecção revelou que os elevados níveis plasmáticos de ET-1 e o remodelamento de matriz extracelular no miocárdio de C57BL/6 infectados mediaram a ativação da via de sinalização de FAK, demonstrada pelo aumento dos níveis de fosforilação de FAK-Y397 e FAK-S910 assim como de ERK1/2, estimulando a resposta hipertrófica evidenciada pelo aumento nos níveis de ANP no miocárdio. Este conjunto de dados sugere que a ativação da via de sinalização de FAK estimula a resposta hipertrófica cardíaca induzida por *T. cruzi*, contribuindo com a progressão da cardiomiopatia chagásica crônica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ROLE OF FOCAL ADHESION KINASE (FAK) IN CARDIAC HYPERTROPHY INDUCED BY *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Amanda Resende Tucci

Chagas disease (CD) is the main cause of heart failure in endemic areas of Latin America. Cardiac hypertrophy and fibrosis are among the main characteristics of chronic chagasic cardiomyopathy (CCC). Therefore, knowledge of signaling pathways active in chagasic hypertrophy is essential for the identification of therapeutic targets. Focal adhesion kinase (FAK), a non-receptor protein tyrosine kinase, has emerged as a signaling pathway that regulates idiopathic cardiac hypertrophy. The activation of FAK, via Serine 910 residue (S-910), by endothelin 1 (ET-1), a vasoconstrictor produced by endothelial cells, cardiomyocytes and cardiac fibroblasts, plays an important role in CCC. Thus, in this study, the participation of FAK in the modulation of hypertrophy induced by *T. cruzi* was analyzed. C57BL/6 mice were infected with *T. cruzi* (Brazil strain) and evaluated for electrocardiographic abnormalities (ECG) and activation of signaling pathways involved in cardiac hypertrophy, including FAK and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). In addition, the expression of the hypertrophy marker gene, atrial natriuretic peptide (ANP), and extracellular matrix components, such as fibronectin (FN) and collagen 1 (COL 1), were evaluated by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and immunohistochemistry, respectively, at different stages of infection (60 to 210 days after infection (dpi)). The incidence of cardiac arrhythmias has been reported in the acute and chronic phases of experimental *T. cruzi* infection. Significant prolongation of the PR interval, as well as a reduction in heart rate, were compatible with the presence of atrioventricular block (BAV) and bradycardia (BRA), prominent at 150 and 180 dpi, evidenced in the ECG analysis. ECG changes were also accompanied by high expression of ANP in cardiac tissue in the chronic phase of infection (150 to 210 dpi) and by increased expression of FN and COL1. Analysis of infection kinetics revealed that elevated plasma levels of ET-1 and remodeling of extracellular matrix in the infected C57BL/6 myocardium mediated activation of the FAK signaling pathway, demonstrated by increased levels of FAK-Y397 and FAK-S910 phosphorylation, as well as ERK1/2, stimulating the hypertrophic response evidenced by the increase in ANP levels in the myocardium. This data set suggests that the activation of the FAK signaling pathway stimulates the cardiac hypertrophic response induced by *T. cruzi*, contributing to the progression of chronic chagasic cardiomyopathy.

ÍNDICE

<u>RESUMO</u>	IX
<u>ABSTRACT</u>	X
I <u>INTRODUÇÃO</u>	
1. Doença de Chagas.....	2
1.1. Cenário epidemiológico.....	2
1.2. Evolução clínica e tratamento da doença.....	5
1.3. Cardiomiopatia Chagásica.....	9
1.4. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca.....	14
1.5. Quinase de adesão focal (FAK) e seu papel na hipertrofia.....	22
II <u>JUSTIFICATIVA</u>	30
III <u>OBJETIVOS</u>	31
3.1. Objetivo Geral.....	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
IV <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	33
4.1. Infecção experimental por <i>T. cruzi</i>	34
4.2. Análise eletrocardiográfica (ECG).....	35
4.3. ELISA.....	35
4.4. Extração de proteínas e Western blotting.....	36
4.5. Imunofluorescência indireta.....	37
4.6. Extração de RNA e transcrição reversa.....	38
4.7. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	38
4.8. Análise estatística.....	39

V	<u>RESULTADOS</u>	40
5.1.	Evolução das anormalidades eletrocardiográficas na infecção de modelo murino por <i>T. cruzi</i>	41
5.2.	Níveis plasmáticos de ET-1 e indução da ativação de FAK na infecção por <i>T. cruzi</i>	45
5.3.	Indução de gene hipertrófico na infecção por <i>T.cruzi</i>	49
5.4.	Resposta fibrótica na cardiomiopatia chagásica	51
VI	<u>DISCUSSÃO</u>	55
VII	<u>CONCLUSÃO</u>	67
VIII	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Dispersão da doença de Chagas na América Latina e nos países não-endêmicos.....	4
Figura 2: Fases clínicas e evolução da doença de Chagas.....	6
Figura 3: Mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca.....	11
Figura 4: Características clínicas e perfis eletrocardiográficos na cardiomiopatia chagásica	13
Figura 5: Formação do complexo proteico durante a mecanotransdução.....	15
Figura 6: Mecanotransdução, estresse mecânico e ativação de integrinas.....	16
Figura 7: Indução da hipertrofia em miócitos cardíacos mediada pela interação entre <i>T. cruzi</i> e TLR2.....	19
Figura 8: Atuação conjunta de ET-1 e <i>T. cruzi</i> e ativação das vias de sinalização.....	20
Figura 9: Indução da hipertrofia cardíaca mediada por FAK	21
Figura 10: Estrutura molecular de FAK e os sítios de fosforilação de tirosina.....	24
Figura 11: Interação de FAK com diferentes receptores de membrana	25
Figura 12: Ativação de FAK na hipertrofia cardíaca.....	28
Figura 13: Resíduos serina de fosforilação da molécula de FAK e ligação de ET-1 ao receptor específico ETA e as vias de sinalização ativadas.....	29
Figura 14: Curva de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados por <i>T. cruzi</i> , cepa Brasil.....	42
Figura 15: Análise do sistema de condução elétrica em C57BL/6 não infectados e infectados por <i>T. cruzi</i>	43
Figura 16: Análise eletrocardiográfica durante infecção experimental por <i>T. cruzi</i> (cepa Brasil) em modelo murino.....	44
Figura 17: Níveis plasmáticos de ET-1 na infecção experimental por <i>T. cruzi</i> em modelo murino	46
Figura 18: Ativação das vias de FAK e ERK1/2 na infecção de C57BL/6 por <i>T. cruzi</i> , cepa Brasil.....	48
Figura 19: Padronização da RT-qPCR e validação da quantificação relativa pelo método de $\Delta\Delta Ct$	50

Figura 20: Expressão de gene hipertrófico na infecção de C57BL/6 por <i>T. cruzi</i>	51
Figura 21: Distribuição espacial e expressão de fibronectina (FN) no miocárdio de camundongos C57BL/6 infectados por <i>T. cruzi</i> , cepa Brasil	53
Figura 22: Detecção de colágeno 1 (COL 1) no tecido cardíaco de C57BL/6 nas fases aguda e crônica da infecção	54
Figura 23: Esquema representativo da sinalização de FAK na hipertrofia chagásica	62
Figura 24: Representação temporal dos eventos observados no modelo murino cronicamente infectado com <i>T. cruzi</i>	63
Tabela 1: Primers e parâmetros das curvas de validação do $\Delta\Delta Ct$, para os alvos endógenos e o marcador de hipertrofia cardíaca em camundongos C57BL/6 infectados por <i>Trypasonoma cruzi</i>	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AKT – Proteína quinase B
AngII – Angiotensina II
ANP – Peptídeo natriurético atrial
ART – Arritmia sinusal
BAV – Bloqueio atrioventricular
BNP – Peptídeo natriurético cerebral
BRA – Bradicardia
BSA – Albumina de soro bovino
BZ – Benzonidazol
CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica
COL 1 – Colágeno 1
COX-2 – Ciclooxigenase-2
DABCO – 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano-trietilenodiamina
DC – Doença de Chagas
DAPI – 4,6-diamino-2-fenilindol
DIVD – diâmetro interno do ventrículo direito
DNDi – Iniciativa medicamentos para doenças negligenciadas
DPI – Dias pós infecção
DTN – Doença tropical negligenciada
DTUs – Unidades discretas de tipagem
ECG – Eletrocardiograma
ERK1/2 – Proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2
ET_A – Receptor transmembranar do tipo A
ET_B – Receptor transmembranar do tipo B
ET-1 – Endotelina-1
EV – Extrassístole ventricular
FA – Adesão focal
FAK – Quinase de adesão focal
FAT – Alvo de adesão focal
FERM – Domínio N-terminal de FAK
FN – Fibronectina
GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GATA 4 – Fator de transcrição GATA ligada à proteína 4
GPCR – Receptores associados à proteína G
Grb2 – Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IFN- γ – Interferon gama
IL – Interleucina
IP3 – Inositol 1,4,5 trifosfato
HPRT – Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
iNOS – Óxido nítrico sintase
JNK – Jun N-terminal quinase
MAPK – Proteínas quinases reguladas por mitógeno
MEC – Componentes de matriz extracelular
MEF2 – Fator 2 de aumento de miócito
mTOR – Rapamicina alvo de mamíferos
NFAT – Fator nuclear de células T ativadas
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
Nfx – Nifurtimox
NO – Óxido nítrico
NRVMs – miócitos ventriculares de camundongos neonatos
OPN – Osteopontina
PBS – Salina tamponada com fosfato
PI3-K – Fosfoinosítideo 3-quinase
PI3K γ – Fosfoinosítideo 3-quinase gama
PGHS – Proteoglicano de heparam sulfato
PKC δ – Proteína quinase C delta
Pro IL-1 β – Pro interleucina - 1 beta
PTKs – Proteínas tirosina quinases
RTKs – receptores tirosina quinase
RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
S910 – Serina 910
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
STK – Serina/treonina quinases
TBS – Solução salina tamponada com tris
TBST – Solução salina tamponada com tris contendo 0.05% de tween 20

TGF- β – Fator de crescimento e transformação beta

TK – Tirosina quinase

TLR – Receptores Toll-like

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

v-Src – Sarcoma quinase viral

Y397 – Tirosina 397

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

1.1. Cenário epidemiológico

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi primeiramente descrita pelo médico sanitaria Carlos Chagas em 1909 no Brasil. Embora o agente causador e as manifestações clínicas tenham sido identificados há mais de 100 anos, a DC permanece como um dos principais problemas de saúde pública na América Latina e ainda, sob o título de doença tropical negligenciada (DTN) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Pérez-Molina & Molina, 2018). Um estudo realizado no Brasil abordando DTNs, no período de 1990 – 2016, revelou que a DC é a principal causa de incapacidade relacionada aos anos de atividade produtiva (Martins-Melo et al., 2016) e, dados adicionais relataram que a doença é responsável pela perda de aproximadamente 752.000 dias úteis devido a mortes prematuras e, um custo de 1,2 bilhões de dólares em produtividade em sete dos doze países da América Sul (Conteh et al., 2010; Pérez-Molina & Molina, 2018).

As medidas de controle adotadas pelos países do Cone Sul em 1991 (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) reduziram os casos de infecção aguda ocasionados por via transfusional e a transmissão vetorial de *T. cruzi* (vetores da subfamília Triatominae), conferindo ao Brasil o certificado de eliminação da transmissão por *Triatoma infestans* em 2006 (Ferreira & Silva, 2006; revisto por Bello Corassa et al., 2016). Esta iniciativa reduziu o número de casos de 20-30 milhões de pessoas no mundo em 1990 para 8 – 10 milhões em 2010, com decréscimo de incidência de novos casos de 700.000 para 28.000 neste mesmo período (Pan American Health Organization, 2011). Atualmente, cerca de 6-8 milhões de indivíduos encontram-se infectados no mundo, estando a maioria dos casos registrados na América Latina, área endêmica da DC (WHO, 2020). A urbanização da população rural na América Latina, que se intensificou a partir da década de 1940, tornou a DC um importante problema médico e social urbano (Coura & Viñas, 2010). Estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas vivam sob risco de infecção (Ministério da Saúde, 2020), com 42.200 novos casos, e que cerca de 10 mil mortes ocorram por ano devido às

manifestações clínicas da DC (WHO, 2020). A prevalência da DC varia entre países, alcançando 1,3% no Brasil e 20% na Bolívia. Embora a taxa anual de novos casos tenha sofrido drástica redução após a implementação de campanhas para o controle vetorial e a triagem em bancos de sangue no Brasil, acredita-se que cerca de 1,2 a 4 milhões de pessoas estejam infectadas no país, causando aproximadamente 6.000 mortes por ano (Martins-Melo et al., 2016; Martins-Melo, 2019). No período de 2000-2011, a DC foi responsável por 76,7% das mortes (58.928 mortes) relatadas por DTNs no Brasil (Martins-Neto et al., 2016), destacando a importância desta doença negligenciada em nosso país.

Apesar destas estratégias terem sido essenciais para minimizar surtos de infecção vetorial, estudos indicam o ressurgimento de *T. infestans* no Estado da Bahia (Araújo et al., 2014) e ainda, o importante papel epidemiológico de vetores secundários, como é o caso de *Triatoma vitticeps*, no Brasil (Alevi et al., 2017; Souza et al., 2011). Além disso, dados atuais revelam que casos de infecção oral representem uma importante via de transmissão de *T. cruzi* na região Norte (Santos et al., 2018). Portanto, a contaminação de alimentos e bebidas com excretas de insetos infectados ou até mesmo o próprio triatomíneo infectado triturado, bem como a ingestão de carne crua ou malcozida de caça e a contaminação de alimentos com urina ou secreção anal de marsupiais infectados, são responsáveis pelos principais surtos de transmissão oral ocorridos nos diferentes países da América Latina (Albuquerque et al., 2018; López-Vélez et al., 2020; OPAS, 2009). Vale considerar que a infecção oral tem sido associada a alta mortalidade e morbidade, incluindo aumento da prevalência e gravidade da patologia cardíaca (miocardite) (Barbosa-Ferreira et al., 2010; Ianni & Mady, 2005; revisado por Simões et al., 2018; Souza et al., 2016).

Nas últimas décadas, a DC tornou-se globalizada com relatos de casos nos Estados Unidos (EUA), Canadá, Europa, Japão e Austrália (**Figura 1**) devido ao intenso processo migratório de indivíduos infectados para os diferentes continentes (Antinori et al., 2017; Coura & Viñas, 2010; Lidani et al., 2019). O diagnóstico da DC representa um grande desafio para países não-endêmicos, devido ao fato da maioria dos imigrantes infectados permanecer na fase crônica indeterminada (assintomática) que favorece a condição silenciosa dessa enfermidade. Cerca de 300.000 imigrantes latinos foram notificados com a fase crônica da doença nos EUA (Bennett et al., 2018), sendo observados ainda

elevados índices de infecção em países de ampla migração sul americana (Schmunis, 2007).

A infecção em países não-endêmicos ocorre por rotas não vetoriais, exceto nos EUA onde 11 espécies de triatomíneo foram identificadas (Klotz et al., 2014) e, recentemente, reportado elevado índice de infecção dos vetores (54%) no sul do país, principalmente no Texas, com relatos de infecção autóctone (Curtis-Robles et al., 2018). Estudos revelaram que a transmissão congênita atinge valores de cerca de 1% no Brasil e que essa taxa pode atingir níveis de até 12% em outros países da América Latina (Dias & Amato Neto, 2011; Dias et al., 2019). Esta via de transmissão é uma rota importante de infecção por *T. cruzi* em países não-endêmicos, sendo o diagnóstico e estratégias de controle essenciais para redução da carga global da doença (Messenger & Bern 2018).

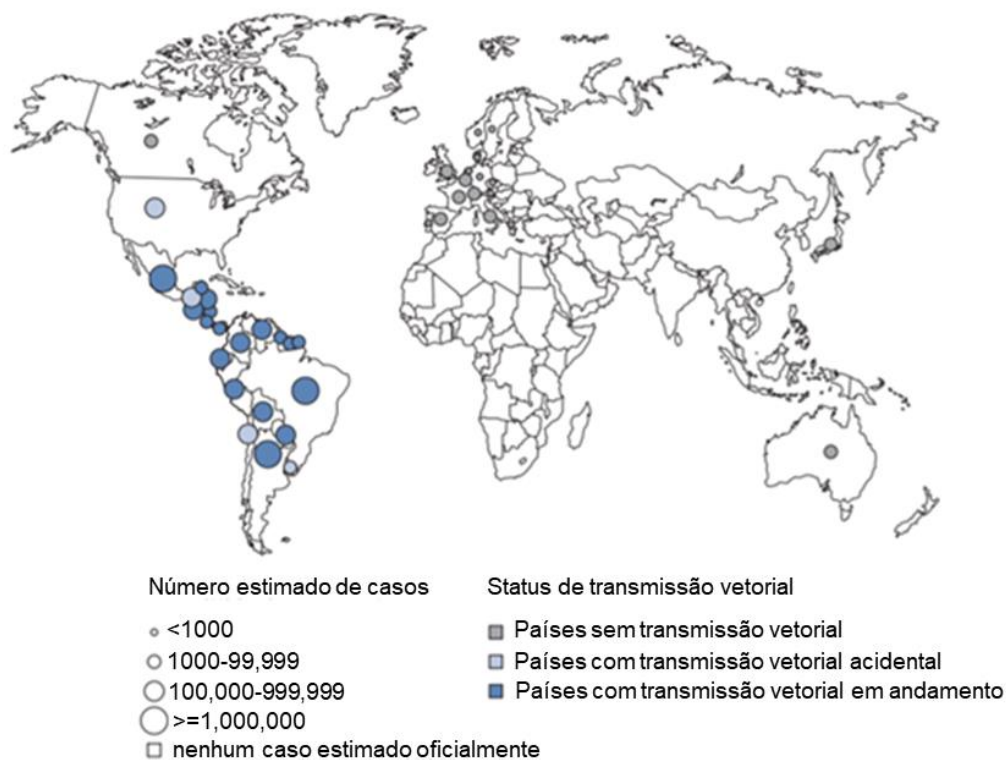


Figura 1: Dispersão da doença de Chagas na América Latina e nos países não-endêmicos. Os valores estimados de indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi* foram demonstrados nas diferentes áreas (em círculo) e o espectro de cores relaciona a incidência de transmissão vetorial nas regiões endêmicas e não endêmicas da doença (Adaptado de López-Vélez et al., 2020).

Considerando que grande parte da população afetada por DTNs vive em países de baixa e média renda, a DC entra nesse cenário impactando diretamente na qualidade de vida, economia e produtividade. Assim, deve-se

compreender que melhorias na saúde influenciam positivamente no bem-estar, fortalecendo a ideia de que ter acesso à saúde é direito de todo ser humano, assim como o desenvolvimento de medidas de controle e eliminação de doenças negligenciadas gerariam importantes efeitos sobre o crescimento econômico nacional e até mesmo global (Dias, 2017; Olivera et al, 2019; Samuels & Pose, 2013; Tarleton et al., 2014). Sob essa perspectiva, a Fundação Bill e Melinda Gates associada a 13 empresas farmacêuticas, juntamente com a OMS, desenvolveu um projeto denominado Declaração de Londres que visa a erradicação ou controle de 10 DTNs, incluindo a DC, até o ano de 2020 (Lee et al., 2018; The London Declaration, 2014; WHO, 2012). No entanto, para que as metas propostas fossem alcançadas seriam necessários esforços que visassem a prevenção, controle e estratégias que otimizem a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos contra as doenças tropicais (Lee et al., 2018; Tarleton et al., 2014). Avanços significativos foram alcançados, incluindo eliminação de transmissão de oncocercose em quatro países das Américas, seis países certificaram livre da transmissão do verme-da-índia desde 2010, houve doação de praziquantel para tratamento da esquistossomose, entre outros (Molyneux, 2016). No entanto, poucos avanços foram evidenciados na DC, mas destaca-se a produção do fármaco de referência (benzonidazol; BZ) na dose pediátrica, aprovação do BZ pela Administração de Medicamentos e Alimentos dos EUA (FDA) e, mais recentemente, a eficácia do BZ em ensaios clínicos utilizando baixas doses e esquema curto de tratamento (Alpern et al., 2017; FDA, 2017; Rial et al., 2017; DNDi, 2019) a ser discutido posteriormente.

1.2. Evolução clínica e tratamento da doença

A DC é caracterizada por duas fases clínicas: uma inicial ou aguda, e outra mais tardia ou crônica (**Figura 2**). No ser humano, a fase aguda da infecção tem duração de 4 a 8 semanas e, embora seja assintomática na maioria dos casos, podem ocorrer sintomas não específicos compatíveis com a replicação intracelular e a intensa parasitemia patente (revisto por Guarner, 2019; Lidani et al., 2019). Nesta fase, a presença de sintomatologia é evidenciada com episódios de febre, lesão inflamatória no local de entrada de *T. cruzi* como

edema unilateral da pálpebra (sinal de Romaña), hepatoesplenomegalia, mialgia, exantema em ambas as pernas, edema de rosto e membros inferiores, manifestações hemorrágicas e convulsões (revisto por Pérez-Molina & Molina, 2018). A infecção de células hospedeiras em diferentes tecidos causa inflamação no coração, trato gastrointestinal (esôfago e cólon), meninges e tecidos nervosos centrais e periféricos, dentre outros (Molina et al., 1988).

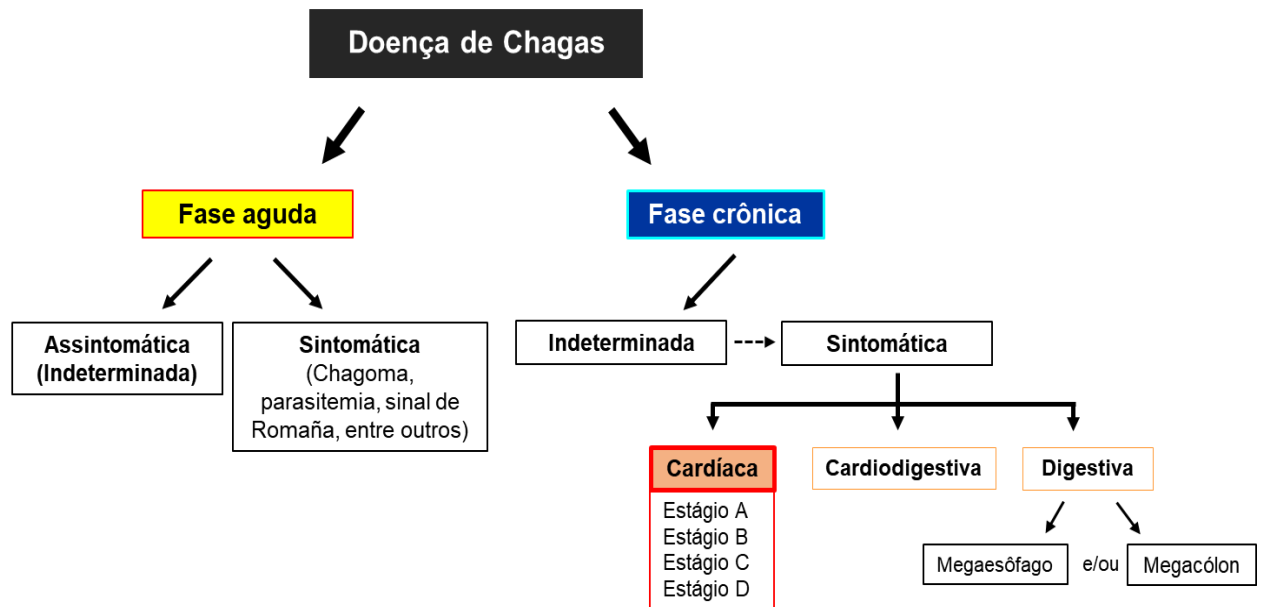


Figura 2: Fases clínicas e evolução da doença de Chagas. A sintomatologia da fase crônica é representada pelos comprometimentos cardíacos (cardiomiopatia) e digestivos (megaesôfago e megacólon) dos indivíduos infectados. (Adaptado de Rassi et al., 2010).

A doença aguda grave também pode ocorrer em cerca de 5% dos pacientes e incluem a miocardite e meningoencefalite, com risco de mortalidade em aproximadamente 1% dos casos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos e crianças com menos de 2 anos de idade (Fernandes et al., 2017; Laranja et al., 1956; López-Vélez et al., 2020; Pittella, 2009). Estudos de fase aguda em modelos animais, demonstraram a presença de formas tripomastigotas em todos os tecidos analisados – com detecção de parasitos bioluminescentes disseminados na cavidade peritoneal (1 dpi); região terminal do intestino grosso, reto e gônadas (7 dpi); coração, membros anteriores e posteriores (14-21 dpi); e gônadas (28 dpi) (Henriques et al., 2014) – além de

relatarem persistência de resposta inflamatória celular de grau variado, com produção de citocinas (Guarner, 2019; Guarner et al., 2001; Powell et al., 1998).

Passada a fase aguda, que geralmente se resolve espontaneamente, os indivíduos progridem para a fase crônica onde a maioria permanece na forma indeterminada por décadas, a qual é caracterizada por sorologia e/ou exames parasitológicos positivos para *T. cruzi* e por ausência de sintomas, de evidências de lesões cardíacas no eletrocardiograma (ECG) e de alterações no esôfago e cólon por estudos radiológicos (Andrade et al., 2011; Dias, 1989; Nunes, et al., 2018). Entretanto, diagnósticos mais sensíveis e sofisticados se mostram necessários, uma vez que o estudo de pacientes crônicos assintomáticos revelou que mais de 50% desses indivíduos possuíam alterações histopatológicas (Carrasco et al., 1987; Pereira et al., 1986), sendo esses achados também observados no modelo canino de infecção crônica por *T. cruzi* (Andrade, 1997). Apesar da ausência de sintomas aparentes, os cães apresentaram danos teciduais com pequenos focos de miocardite crônica leve, edema intersticial, fibrose e infiltrado de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas (Andrade et al., 1997; Nunes, 2018). Contudo, é relevante considerar que uma parcela dos indivíduos infectados é notificada com distúrbios no estágio mais tardio da doença, os quais se caracterizam pela presença de desordens cardíacas (20 a 30%), digestivas (10 a 15%), neurológicas (<5%) ou mistas (cardíaca e digestiva) (Nunes et al., 2018; Rassi Jr. et al., 2012).

As alterações cardíacas configuram os problemas mais frequentes e graves decorrentes da infecção parasitária e a cardiomiopatia é a principal manifestação clínica que acomete indivíduos cronicamente infectados. Diante desse quadro, é importante mencionar que a incapacidade laboral e a mortalidade geradas pela DC se devem, principalmente, à cardiopatia chagásica crônica (CCC), que atualmente atinge cerca de 1,2 milhões de indivíduos no Brasil e é considerada a principal causa de insuficiência cardíaca causada por agentes infecciosos em países da América do Sul (revisto por Bocchi 2013; revisto por Simões et al., 2018; WHO 2015).

O tratamento para DC ainda é considerado um grande desafio dentro da abordagem terapêutica, estando atualmente limitado ao uso dos fármacos nifurtimox (Nfx – produzido pela Bayer) e principalmente BZ (atualmente produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE)

– Brasil e o laboratório Elea – Argentina), que atuam com 60-80% de eficácia na fase aguda da doença (incluindo casos de transmissão congênita e reativação durante a fase crônica) (Altcheh et al. 2011; Bartsch et al., 2018; Bern, 2011; revisto por Bonney, 2014). Estes fármacos são caracterizados pelo elevado grau de efeitos adversos devido à toxicidade intrínseca do medicamento e ao tempo prolongado de administração (60 a 90 dias) (Jackson et al., 2020; Kratz et al., 2018; Morilla & Romero, 2015). A Iniciativa de desenvolvimento de novos medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) considera que o tratamento atual apresenta muitos efeitos colaterais e acarreta elevado índice de abandono. Ainda, é importante considerar que muitos pacientes não são diagnosticados na fase inicial da doença e que, portanto, desconhecem seu quadro clínico impossibilitando o tratamento.

Ensaio clínico têm contribuído com avanços no desenvolvimento de novos fármacos e/ou regimes de tratamentos, visando avaliação da eficácia e segurança terapêutica. O ensaio clínico CHAGAZOL avaliou a eficácia de posaconazol, um antifúngico que inibe a biossíntese de ergosterol, administrado em suspensão oral em monoterapia comparado ao BZ. Os resultados revelaram falha terapêutica de posaconazol no tratamento de pacientes com baixa dose (100 mg – 2x/dia) e alta dose (400 mg – 2 x/dia) por 60 dias, apresentando 92% e 81% dos pacientes positivos para *T. cruzi*, respectivamente, comparado com BZ (6%) (Molina et al., 2014). O ensaio clínico STOP-Chagas, que avaliou o efeito do posaconazol (400 mg – 2x/dia) em terapia combinada com BZ, também resultou em dados insatisfatórios. Posaconazol apresentou eficácia similar ao placebo (17%) comparado ao BZ em monoterapia (200 mg – 2x/dia) ou terapia combinada com posaconazol (96%) (Morillo et al., 2017). O ensaio clínico com E1224 (fosravuconazol) demonstrou uma redução transiente da carga parasitária, comparado ao BZ que se manteve sustentável por 12 meses de acompanhamento clínico, mas E1224 apresentou boa tolerabilidade (Torrico et al., 2018), sendo recomendado um novo ensaio de terapia combinada com BZ. O ensaio clínico de fase II com fexinidazol, iniciado em 2014, foi interrompido por motivos de baixa tolerabilidade, mas alta eficácia foi encontrada no regime curto com doses mais baixas (1200 mg), levando ao estabelecimento de novo ensaio clínico, iniciado em 2017, utilizando regimes de baixa doses e tempos curtos de tratamento com previsão de término em 2020.

Uma lacuna no conhecimento sobre a farmacocinética de nifurtimox em crianças, motivou o desenvolvimento do ensaio clínico CHICO (*Chagas disease In Children treated with Nifurtimox*), realizado pela Bayer, visando demonstrar a farmacocinética, segurança e eficácia de uma nova formulação do medicamento para tratar crianças nas fases aguda e crônica da doença (GT- Chagas, 2019). O estudo demonstrou superioridade na eficácia de tratamentos longos (60 dias) comparado aos curtos períodos de tratamento (30 dias) ou placebo e ainda, boa tolerância ao medicamento. Além disso, o ensaio clínico BENDITA (*BEznidazole New Doses Improved Treatment and Associations*), que avaliou a eficácia do BZ em baixa dose e regime curto de tratamento (300 mg por 2 semanas), revelou eficácia similar ao tratamento padrão (300 mg por 8 semanas) e em terapia combinada com fosravuconazol (E1224), além de redução dos efeitos colaterais, favorecendo a ampliação do tratamento em países endêmicos e minimizando as taxas de abandono por efeitos adversos. No entanto, não há relatos sobre seu efeito sobre a progressão da cardiomiopatia chagásica crônica (DNDi 2019). Por outro lado, os dados do ensaio clínico BENEFIT (Avaliação do Benzonidazol para Interrupção da Tripanossomíase) revelaram a incapacidade do BZ em prevenir a evolução da cardiomiopatia chagásica crônica (Morillo et al., 2015), uma importante manifestação clínica da doença.

1.3. *Cardiomiopatia Chagásica*

A cardiomiopatia é definida como um grupo heterogêneo de doenças associadas à disfunção mecânica e/ou elétrica que afeta diretamente o miocárdio (Maron et al., 2006). De acordo com a OMS e a Federação e Sociedade Internacional de Cardiologia (1995), a doença pode se manifestar nas formas dilatada, hipertrófica e restritiva, desencadeada por uma variedade de fatores, como é o caso das alterações genéticas (casos mais frequentes) e os agentes infecciosos. Sob foco deste estudo, será considerada apenas a cardiomiopatia chagásica hipertrófica que se caracteriza pelo espessamento da parede do ventrículo esquerdo, decorrente especificamente do aumento da massa cardíaca, e que pode gerar redução do volume ventricular (Maron et al., 2006; Maron & Maron, 2013).

A CCC é desencadeada por inflamação crônica, de baixa intensidade, porém constante, que gera destruição tissular progressiva e fibrose no coração. Embora a patogênese da CCC não seja completamente elucidada, evidências demonstram que a persistência do parasito (revisto por Tarleton, 2001) e a resposta imune do hospedeiro (Gomes et al., 2003; Pereira et al., 2018; Rocha Rodrigues et al., 2012) são responsáveis por provocar o desenvolvimento de miocardite crônica que afeta todas as câmaras do coração, os nervos cardíacos parassimpáticos e o sistema de condução. Desta forma, esses fatores são fortes contribuintes para a progressão da doença cardíaca (Healy et al., 2015; Marin-Neto et al., 2007; revisto por Bonney et al., 2019; Roffe & Murphy, 2018). Diante desse cenário, o ambiente inflamatório gerado nos tecidos dos hospedeiros, com produção de citocinas e mecanismos citotóxicos que incluem células T CD8⁺, em associação com a virulência de *T. cruzi* e o tropismo tecidual são fatores cruciais que influenciam no desenvolvimento de cardiomiopatia grave (Dutra et al., 2014; Ferreira et al., 2017; Machado et al., 2012; Poveda et al., 2014; Nunes et al., 2018).

O crescimento hipertrófico do coração é uma resposta adaptativa ao estresse hemodinâmico e atua como um efeito compensatório para melhorar o desempenho cardíaco e reduzir a tensão da parede ventricular (Berenji et al., 2005; Lazzeroni et al., 2016). Fisiologicamente, a hipertrofia do coração pode ocorrer na presença de condições estressantes crônicas o que acarreta uma forma de hipertrofia patológica. Durante este evento, ocorre inicialmente crescimento concêntrico dos miócitos (a largura aumenta desproporcionalmente em comparação ao comprimento) na resposta à sobrecarga, gerando redução excessiva no diâmetro da cavidade ventricular. Subsequentemente, com a progressão hipertrófica, ocorre o crescimento excêntrico das células (crescimento proporcional em comprimento e largura) que resulta em alongamento dos cardiomiócitos e dilatação da câmara ventricular (**Figura 3**). Essa condição fenotípica é acompanhada de disfunção contrátil com redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, fibrose com elevada produção de colágeno I e insuficiência cardíaca (Berenji et al., 2005; Heineke & Molkentin, 2006; Kannel et al., 1987; revisto por Nakamura & Sadoshima, 2018; revisto por Zeitz & Smyth, 2020).

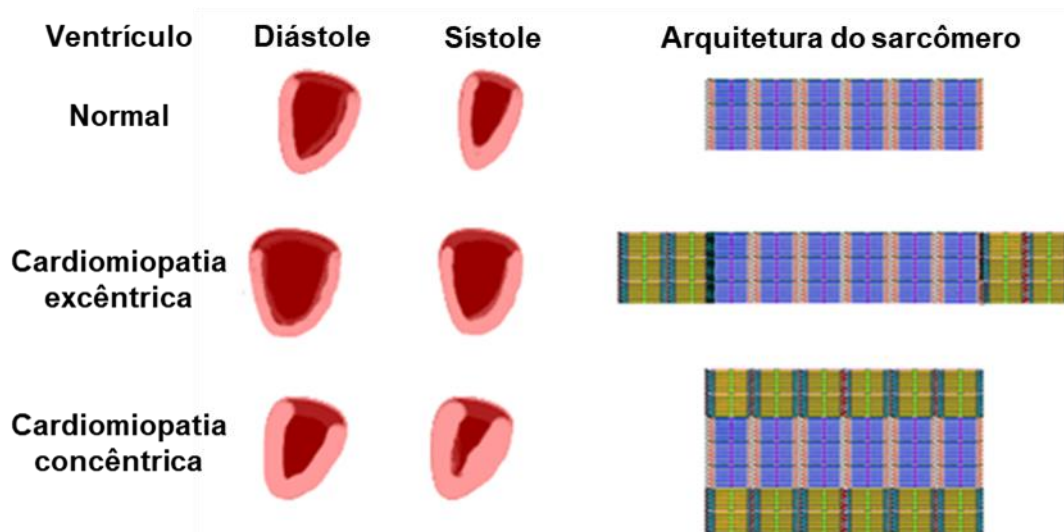


Figura 3: Mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca. Crescimento de cardiomiócitos e aumento na síntese de proteínas sarcoméricas induz o aumento do coração. Na hipertrofia patológica, ocorre inicialmente o crescimento concêntrico caracterizado pelo espessamento dos miócitos cardíacos e da parede dos ventrículos, o que resulta em redução das dimensões das câmaras ventriculares, bem como do volume diastólico final. Progressivamente, na hipertrofia excêntrica ocorre alongamento dos cardiomiócitos com elevada formação de miofibrilas, o que leva à dilatação da câmara ventricular, aumento no volume diastólico final e função contrátil comprometida. Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada e reduzida pode ser evidenciada durante a cardiomiopatia hipertrófica. (Adaptado de: http://www.rnceus.com/CHF_16/stageB.html).

Contudo, esses danos refletem as alterações que ocorrem a níveis celulares que são representadas pela elevada expressão dos genes fetais que codificam para a cadeia pesada de miosina, isoforma β de músculo cardíaco e α -actina de músculo esquelético, e também para peptídeo natriurético atrial (ANP) e peptídeo natriurético cerebral (BNP), os quais favorecem a produção de novos sarcômeros (unidades funcionais contráteis da fibra muscular) e, conseqüentemente, de miofibrilas de forma que aumente a contratibilidade do órgão (Carreño et al., 2006; Frey et al., 2004; revisto por Nakamura & Sadoshima, 2018). Portanto, é considerado que os miócitos cardíacos possuem baixa capacidade multiplicativa e que o aumento da massa muscular é decorrente da adição de sarcômeros dentro da fibra muscular pré-existente (Franchini, 2001; Clemente et al., 2012; Nakamura & Sadoshima, 2018).

O perfil sintomatológico na fase crônica da DC revela alterações no ritmo cardíaco, detectadas por eletrocardiograma (ECG), que estão correlacionadas

com as alterações clínicas evidenciadas nos pacientes cardiopatas (**Figura 4**). Essas manifestações incluem disfunção do nodo sinusal gerando bradicardia (BRA) grave, bloqueio atrioventricular (BAV) de alto grau com intervalo PR prolongado, taquicardia e extrassístole ventricular (EV), cardiomiopatia dilatada progressiva com insuficiência cardíaca congestiva, aneurisma apical (geralmente no ventrículo esquerdo) e formação de trombos frequentemente no ventrículo esquerdo dilatado (Rassi & Little, 2000; revisto por Brito & Ribeiro, 2018). É importante ainda reforçar que este quadro clínico é responsável por 55-65% dos óbitos por morte súbita em indivíduos infectados, seguida de insuficiência cardíaca refratária e tromboembolismo (Rassi et al., 2001; revisto Simões et al., 2018). Em paralelo, é relevante considerar que embora as características fenotípicas da CCC sejam bastante similares ao descrito na cardiomiopatia dilatada idiopática, esta última parece estar associada a pré-disposição genética e/ou mutações nos genes de proteínas sarcoméricas (Stein, 2017). Por outro lado, a hipertrofia chagásica parece estar relacionada à persistência do parasito que acarreta infiltrado inflamatório e dano tissular com elevada fibrose do miocárdio (revisto por Bonney et al., 2019).

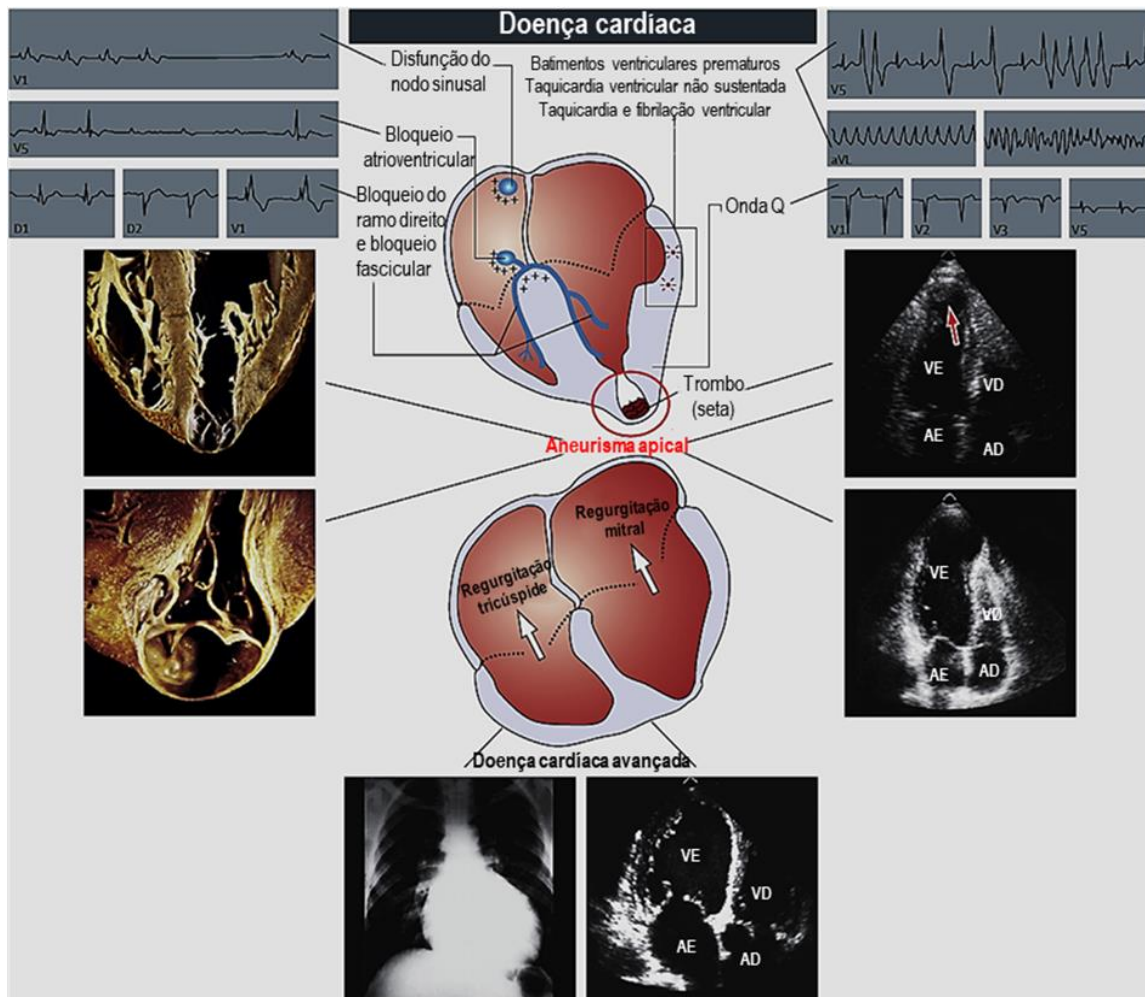


Figura 4: Características clínicas e perfis eletrocardiográficos na cardiomiopatia chagásica. A disfunção do nodo sinusal observada em pacientes com CCC pode acarretar bradicardia sinusal e bloqueio atrioventricular. A presença de aneurisma apical e formação de trombos também são observados no ventrículo esquerdo dilatado nos indivíduos cronicamente infectados (Adaptado de Healy et al., 2015; Retirado de: Rassi et al., 2010; com permissão de reprodução de Rassi et al., 2009).

Os danos cardíacos na CCC são progressivos e podem ser classificados em quatro estágios (**A**, **B** (B1 e B2), **C** e **D**) de acordo com a gravidade da doença (Andrade et al., 2010). No estágio A são incluídos os pacientes indeterminados, que não apresentam os sintomas prévios de insuficiência cardíaca e cardiopatia estrutural (ECG e raio X de tórax normais). No estágio B são encontrados os pacientes apresentando cardiopatia estrutural, sem sinais e sintomas de insuficiência cardíaca, sendo a classificação B1 reportada em pacientes com alterações eletrocardiográficas leves (arritmias e desordens na condução elétrica) e ecocardiográficas discretas (anormalidades da contratilidade regional), mas com boa função ventricular global, ou B2 com disfunção

ventricular apresentando fração de ejeção do ventrículo esquerdo reduzida. No estágio C estão inseridos os grupos de pacientes com disfunção do ventrículo esquerdo e com sintomas prévios ou atuais de insuficiência cardíaca, enquanto no estágio D estão incluídos pacientes com insuficiência cardíaca em repouso, refratária à terapia médica maximizada, exigindo intervenções intensivas. Assim, o quadro sintomático e o grau da doença apresentado por pacientes portadores da DC com hipertrofia cardíaca são dependentes da natureza do estímulo e dos mecanismos de sinalização ativados (Andrade et al., 2010).

1.4 – Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia cardíaca

Como descrito anteriormente, o estresse mecânico pode disparar modificações estruturais, funcionais e sinalizadoras que resultam em diferentes processos celulares, incluindo a regulação eletrofisiológica, regulação de canais de cálcio, função contrátil e a transcrição de genes hipertróficos em células musculares cardíacas (revisto por Lyon et al., 2015). Este processo denominado de mecanotransdução pode ser definido como resposta bioquímica dos cardiomiócitos ao estímulo mecânico. Desta maneira é compreendido que, a depender do estímulo gerado, pode haver aumento da sarcomerogênese, ocasionando o crescimento dos miócitos cardíacos e o espessamento da parede ventricular (Lammerding et al., 2004), havendo assim a participação de proteínas mecanossensitivas e relevantes complexos proteicos (Swynghedauw, 2016), incluindo integrinas.

Integrinas são moléculas transmembranares heterodiméricos (subunidades α e β) situados em regiões costaméricas e dos discos intercalares (revisto por Brancaccio et al., 2006), atuam como importantes agentes mecanotransdutores (Ross et al., 2013) e são responsáveis por conectar os componentes de matriz extracelular (MEC) ao citoesqueleto de actina intracelular (revisto por Sun et al., 2016). Durante o estresse mecânico, as integrinas são ativadas, estabelecem ligação com a MEC, se agregam na membrana celular e sinalizam para o acoplamento de talina à sua cauda citoplasmática β (**Figura 5**) (revisto por Kechagia et al., 2019; Sun et al., 2016). Enquanto o domínio N-terminal de talina se mantém associado ao receptor celular, na região C-terminal dessa molécula

são encontrados sítios de ligação para vinculina (Alberts et al., 2017). Estas duas proteínas estruturais ativadas por um mecanismo que envolve alterações conformacionais mediadas por tensão (Atherton et al., 2015), se unem e modulam a ligação das integrinas ao complexo actina-miosina, via α -actinina (Roca-Cusachs et al., 2013). Além disso, estabilizam o complexo de adesão focal (FA) (Humphries et al., 2007). Progressivamente, as proteínas talina e kindlina auxiliam na ativação das integrinas, sendo a kindlina ainda responsável por recrutar paxilina, que por sua vez se liga à quinase de adesão focal (FAK) (Theodosiou et al., 2016). A fosforilação dos resíduos tirosina de FAK e recrutamento de paxilina são eventos essenciais para orquestrar a sinalização celular (**Figura 5**) (Stutchbury, et al., 2017).

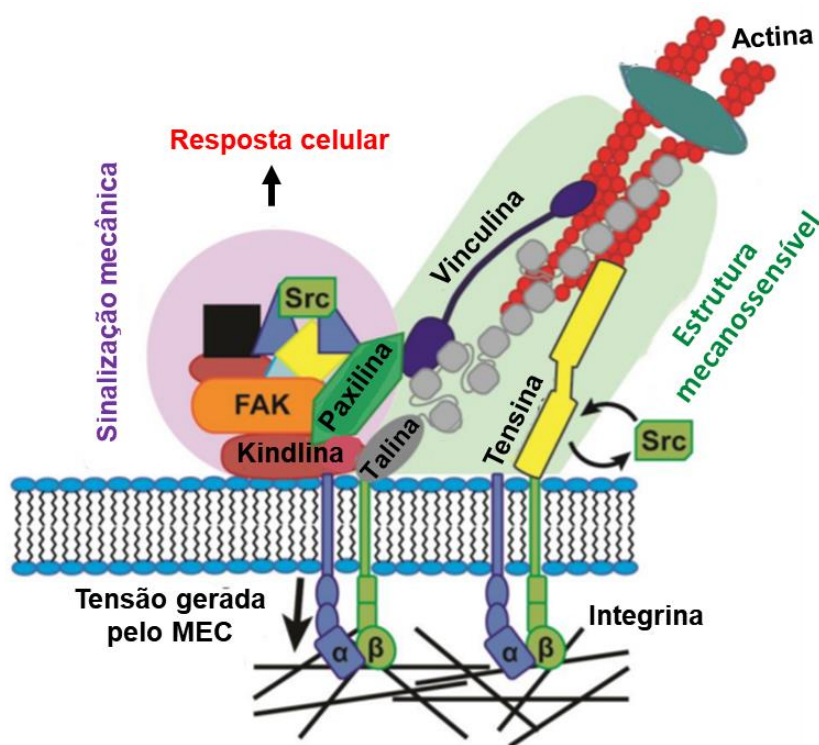


Figura 5: Formação do complexo proteico durante a mecanotransdução. Estímulo mecânico externo é direcionado ao meio intracelular através da interação dos componentes de matriz extracelular (MEC) – integrinas – proteínas de adesão focal (FA). As proteínas estruturais talina e vinculina ativadas encontram-se fortemente associadas à integrina e aos filamentos de actina. Os sinais mecânicos extracelulares são transferidos para o sítio de FA e induzem a fosforilação de paxilina e FAK, estas ativadas podem modular diferentes vias de sinalização e respostas distintas na célula alvo. (Adaptado de Stutchbury et al., 2017).

A ativação de integrinas e o estabelecimento do sítio de FA dispara cascatas de sinalização distintas que atuam na biossíntese de proteínas sarcoméricas, culminando com o crescimento dos cardiomiócitos (revisto por

Harston & Kuppuswamy, 2011). Evidências revelaram que as subunidades β_1 e β_3 presentes nas integrinas podem disparar a via de fosfoinosítídeo 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) (Menon et al., 2007). A isoforma PI3K γ tem sido destacada como responsável por ativar o programa gênico na hipertrofia mal adaptada (Patrucco et al., 2004) e induzir a sinalização de Akt envolvida no remodelamento cardíaco (O'Neill & Abel, 2005). Ainda, a interação de integrina β_3 com ubiquitinas pode ativar NF- κ B que induz a transcrição de genes anti-apoptóticos responsáveis pela geração da resposta de sobrevivência dos cardiomiócitos, bem como a manutenção ventricular, mediante sobrecarga do coração (Johnston et al., 2009). A formação de complexos de FA pode disparar a via Ras/ proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) e Akt (Iijima et al., 2002; revisto por Harston & Kuppuswamy, 2011). Ainda, em condições de sobrecarga cardíaca, a interação direta da subunidade β das integrinas com FAK e Src promove ativação de FAK, culminando no recrutamento de Src, PI3K e fosforilação das proteínas quinases reguladas por mitógeno (MAPK) e que essa rede proteica intimamente integrada se torna capaz de induzir a sinalização hipertrófica (**Figura 6**) (revisto por Harston & Kuppuswamy, 2011) que será apresentada em detalhe posteriormente.

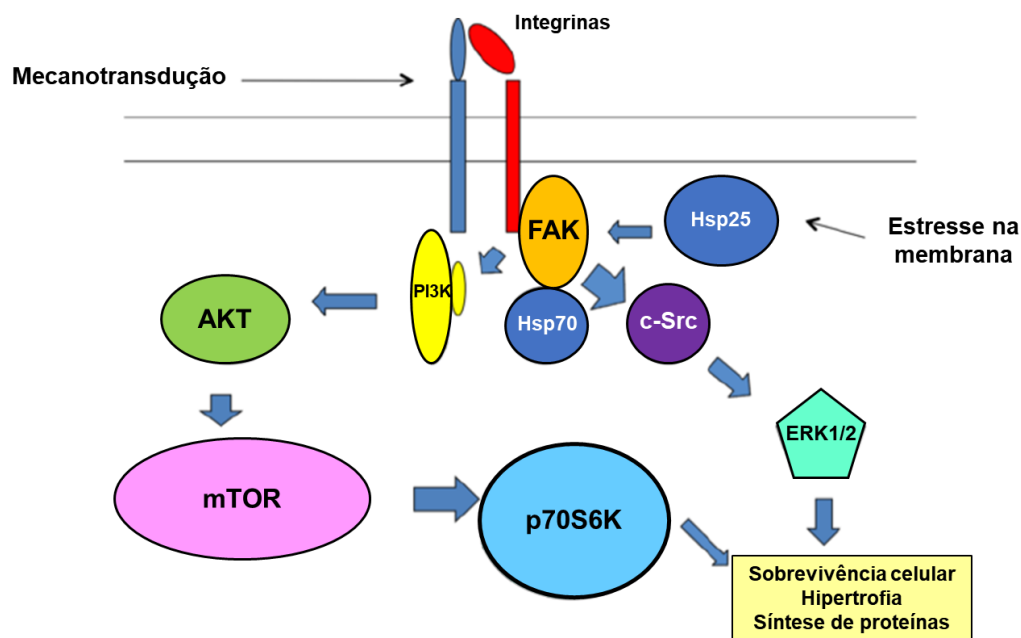


Figura 6: Mecanotransdução e estresse mecânico ativam as integrinas que são responsáveis pela autoativação de FAK. Este mecanismo pode ativar as vias de sinalização FAK/c-Src/ERK1/2 e/ou FAK/PI3K/AKT/mTOR que modula a sobrevivência das células, a síntese de proteínas sarcoméricas e a hipertrofia em miócitos cardíacos (Adaptado de Graham, 2010).

Por outro lado, existem estímulos externos que atuam diretamente sobre os receptores da superfície celular e que levam à ativação de cascatas envolvidas com a resposta hipertrófica na célula alvo. O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e o fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) atuam sob os receptores tirosina quinase (RTKs) e promovem diretamente o crescimento dos miócitos cardíacos. As moléculas de catecolaminas, angiotensina II (AngII) e endotelina-1 (ET-1) se ligam aos receptores acoplados à proteína G e desencadeiam respostas relacionadas à hipertrofia de miócitos e remodelamento de matriz extracelular (Barry et al., 2008; Chiquet et al., 2009; Mehra et al., 2003; Samak et al., 2016; revisto por Saucerman et al., 2019), fortalecendo a ideia do importante papel fisiológico e farmacológico relacionados aos agentes hipertróficos.

Nos estudos envolvendo a participação de moléculas atuantes nas patologias cardiovasculares, foi demonstrado o papel de ET-1 na patogenia das cardiomiopatias idiopática e chagásica, contribuindo com a injúria vascular, hipertrofia de cardiomiócitos, remodelamento cardíaco e aumento na liberação de agentes inflamatórios (Hoffman et al., 2019; Rigazio et al., 2014; Tanowitz et al., 2005; Wang et al., 2017; Yang et al., 2004). ET-1 é uma das três isoformas de endotelina (ET-1, ET-2 e ET-3) e é definida como um peptídeo vasoativo que age através de receptores transmembranares, ET_A e ET_B, ligados à proteína G (Arai et al., 1990; Masaki et al., 2004; revisto por Freeman et al., 2014). A ligação de ET-1 ao receptor ET_A leva ao aumento nas concentrações de cálcio intracelular, o que resulta na contração da musculatura lisa e seu potente efeito vasoconstritor, enquanto que na interação com o receptor ET_B gera a vasodilatação e produção de óxido nítrico (NO) nas células endoteliais (Bouallegue et al., 2007; Tsukahara et al., 1994). É importante ressaltar que a ativação exacerbada dessas vias de sinalização pode ser responsável pela progressão das doenças cardiovasculares.

O papel de ET-1 na cardiomiopatia chagásica foi observado nos ensaios experimentais com células endoteliais e em camundongos infectados com *T. cruzi*, e revelaram aumento na síntese de ET-1 no plasma sanguíneo e tecido cardíaco (Petkova et al., 2000, 2001, Tanowitz et al., 2005). A elevada expressão desse peptídeo também foi evidenciada no sistema vascular (Corral et al., 2013), incluindo artérias carótidas (Hassan et al., 2006), durante infecção experimental

murina por *T. cruzi*. A elevada síntese dessa proteína também ocorre em diferentes células do sistema cardiovascular (cardiomiócitos, fibroblastos e macrófagos) (revisto por Machado et al., 2012) e seus níveis aumentados estão diretamente relacionados com o dano miocárdico e endotelial (revisto por Freeman et al., 2014) e justifica o vasoespasmo e a isquemia vascular decorrentes da infecção (Petkova, et al., 2001). Adicionalmente, dados em modelo murino geneticamente modificados revelaram que a deleção do gene de ET-1 nos miócitos cardíacos acarreta redução no diâmetro da parede ventricular e no quadro de fibrose, em comparação aos animais selvagens (*wild type*) infectados por *T. cruzi* (Tanowitz et al., 2005). Além disso, é importante mencionar que o aumento nos níveis de ET-1 plasmáticos e no miocárdio não foram identificados apenas no modelo murino de infecção (Petkova et al., 2001; Sakai et al., 1996; Tanowitz et al., 2005), mas também em pacientes portadores da doença de Chagas com disfunção cardíaca grave (Pengue et al., 2019; Salomone et al., 2001) e demonstra a participação ativa dessa molécula no processo de remodelamento cardíaco e na progressão da patogênese da CCC.

Múltiplas vias de sinalização foram identificadas na hipertrofia induzida por *T. cruzi*, incluindo a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), envolvido na produção de pro interleucina 1 beta (pro IL-1 β) por um mecanismo dependente de receptores Toll-like 2 (TLR2) (**Figura 7**) (Petersen et al., 2005; revisto por Pereira et al., 2018), e das vias mediadas por ET-1 que sinaliza para fosforilação da ERK1/2, resultando na expressão dos genes de ciclina-D1 e de mediadores inflamatórios (Petkova et al., 2001; revisto por Jiménez et al., 2018). Além disso, a via de PI3K/AKT/óxido nítrico (NO) também foi identificada participando da disfunção cardíaca evidenciada na DC, incluindo hipertrofia cardíaca, alteração na corrente iônica e na contratilidade de cardiomiócitos, que podem estar associados ao desbalanço de substâncias vasoativas (ET-1 e NO) moduladas pelos elevados níveis plasmáticos de TGF- β na fase aguda e crônica da doença (Roman-Campos et al., 2013). Destaca-se ainda, que além da sinalização PI3K/AKT/NO sustentar a produção de NO, as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) também desempenham importante papel no processo de síntese de óxido nítrico sintase (iNOS) nos miócitos cardíacos infectados por *T. cruzi* (Machado et al., 2000; Roman-Campos et al., 2013).

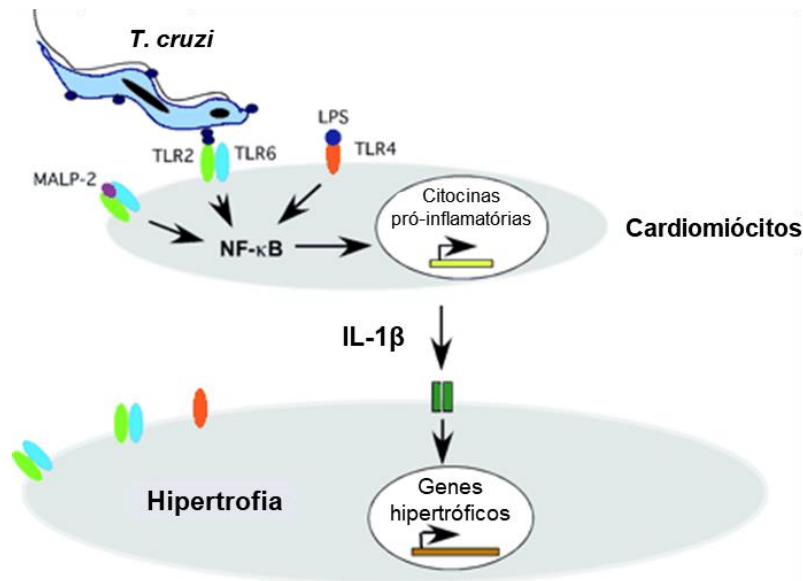


Figura 7: Indução da hipertrofia em miócitos cardíacos mediada pela interação entre *T. cruzi* e TLR2. A cascata de sinalização é iniciada quando ligantes do parasito, ou moléculas secretadas por suas formas tripomastigotas, se ligam ao heterodímero TLR2/6 presentes na superfície dos cardiomiócitos. Subsequentemente, a via NF-κB é ativada e estimula a produção da citocina pró-inflamatória IL-1β que é secretada, ativando a transcrição de genes envolvidos com a resposta hipertrofica tanto nas células infectadas, quanto nas células vizinhas não infectadas (Adaptado de Petersen et al., 2005).

Evidências demonstram que, em miócitos atriais, a ação combinada de ET-1 e a infecção por *T. cruzi* ativa a via Ca^{2+} /calcineurina/ fator nuclear de células T ativadas (NFAT), aumentando os níveis de ciclooxygenase-2 (COX-2) que culmina no aumento na biossíntese de prostaglandinas e de ANP (**Figura 8; A**) (Corral et al., 2013; Íñiguez et al., 2000; Hernández et al., 2018). Além disso, o efeito conjunto de ET-1 e a infecção parasitária também estimula a via de fator de transcrição GATA ligada à proteína 4 (GATA 4), envolvida na produção do BNP e iNOS (He et al., 2002; Rigazio et al., 2014; Rysa et al., 2010). Ainda, ET-1 é capaz de modular a ativação de MAPKs, as quais desempenham papel fundamental na hipertrofia cardíaca patofisiológica, destacando-se ERK1/2 como reguladora da transcrição dos genes responsivos à hipertrofia (**Figura 8; B**) (Bupha-Intr, et al., 2012; revisto por Bueno & Molkentin, 2002). ET-1 é capaz de elevar os níveis intracelulares de cálcio que, em associação com a ativação de ERK1/2, gera mediadores inflamatórios contribuindo para a cardiomiopatia chagásica (revisto por Freeman et al., 2014; Hassan et al., 2006; Huang et al., 2000; Morris et al., 1988; revisto por Jiménez et al., 2018). Ressalta-se ainda, que a fosforilação de ERK1/2 durante a resposta hipertrofica, além de ser

regulada pelos receptores de ET-1, também conta com a participação de integrinas, outros receptores acoplados a proteína G, canais iônicos, fatores de crescimento e proteínas tirosina quinases (Franchini, 2001; 2012).

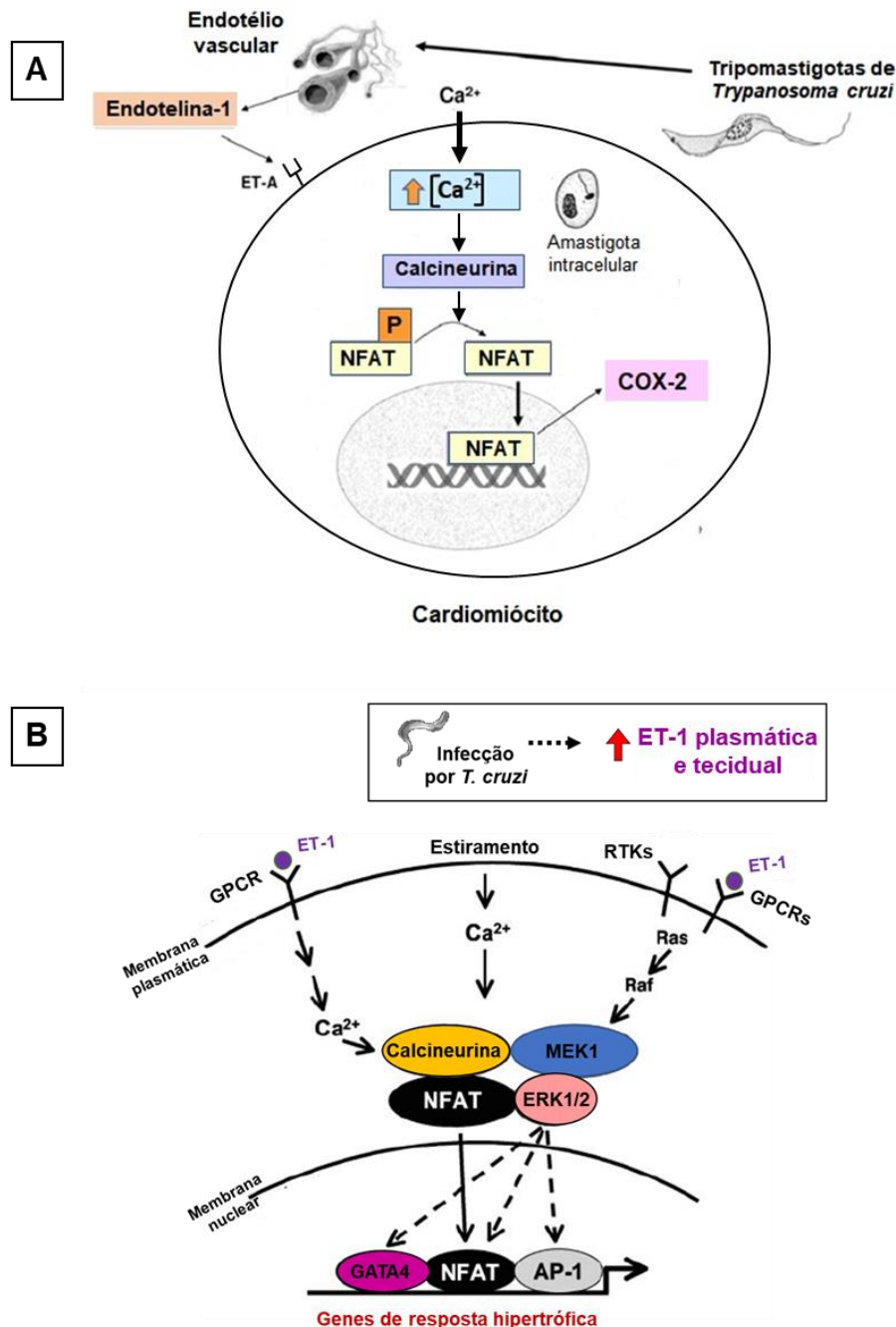


Figura 8: A atuação conjunta de ET-1 e *T. cruzi* modula a produção de mediadores inflamatórios, via Ca²⁺/calcineurina/NFAT, e é um dos fatores contribuintes ao dano cardíaco (A). As cascatas calcineurina/NFAT e MEK1-ERK1/2, mediadas por receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e/ou receptores tirosina quinase (RTKs), e a via indutora de Ca²⁺, estimulada por sobrecarga de pressão, regulam a expressão de importantes fatores de transcrição atuantes na resposta hipertrófica (GATA4 e AP-1) (B). A ativação de calcineurina ocorre devido aos elevados níveis intracelulares de Ca²⁺ e promove a desfosforilação de NFAT citoplasmática que se transloca para o núcleo e induz a transcrição de genes atuantes na sarcomerogênese dos miócitos cardíacos (B). (Adaptado de: (A) Hernández et al., 2016. (B) Sanna et al., 2005).

Como descrito anteriormente, ERK1/2 é considerada uma das vias de sinalização centrais ativadas em células musculares cardíacas durante o fenótipo hipertrófico e, neste cenário, é reconhecido que fatores humorais ou a sobrecarga biomecânica podem ativá-la e, subsequentemente, levar à sua translocação nuclear (**Figura 9**). Estudos em camundongos geneticamente deficientes em ERK, reforçaram o papel direto dessa via na hipertrofia cardíaca induzida por estresse mecânico ou patologias (Liang & Sheikh, 2016). Ainda, dados demonstraram a ativação das vias Ras-Raf1-MEK1/2 antecedendo a ativação de ERK1/2 na cascata de sinalização da resposta hipertrófica (Lorenz et al., 2009).

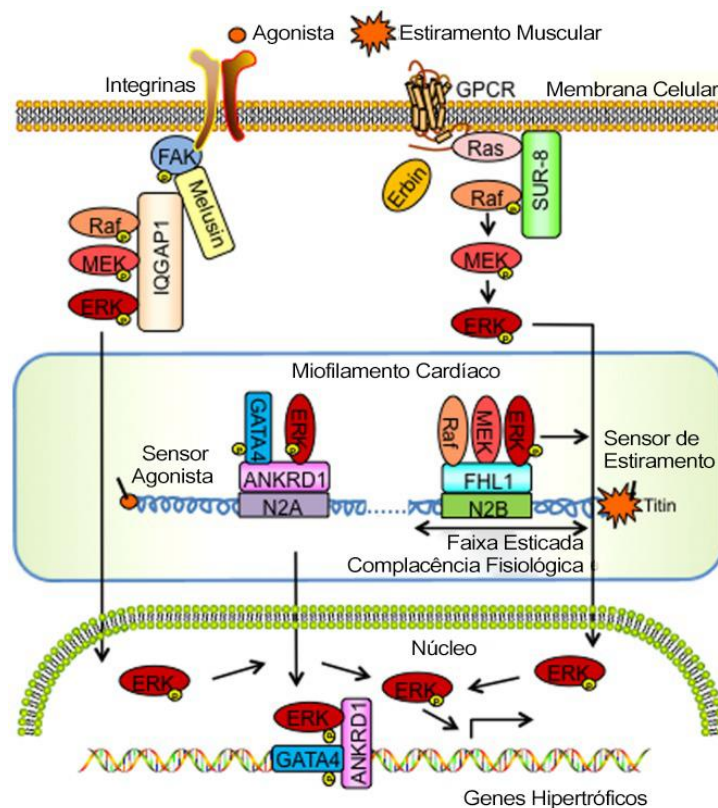


Figura 9: A indução da hipertrofia cardíaca mediada por FAK, em um processo dependente de integrinas, ou receptores associados à proteína G (GPCR). As cascatas de sinalização acarretam fosforilação de ERK1/2 que transloca para o núcleo ativando os genes envolvidos na hipertrofia (Adaptado de Liang & Shelk, 2016).

Adicionalmente, achados apontam a participação de FAK modulando a fosforilação de ERK1/2 na hipertrofia cardíaca idiopática, em um mecanismo de ativação de FAK dependente de ET-1 (Chu et al., 2011). Portanto, considerando que o extenso repertório de moléculas interligadas e ativadas no fenótipo hipertrófico idiopático e chagásico apresentam similaridades, e reconhecendo a

participação de FAK como via de sinalização reguladora da hipertrofia na cardiomiopatia idiopática, este estudo visa elucidar o papel de FAK no disparo da hipertrofia na cardiomiopatia chagásica. Assim, aspectos sobre esta proteína tirosina quinase não receptora serão abordados para melhor entendimento de seu mecanismo de ação.

1.5. Quinase de adesão focal (FAK) e seu papel na hipertrofia

As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de diferentes substratos por um mecanismo reversível de adição de um grupo fosfato (PO_4), proveniente da molécula de ATP, ao grupamento hidroxila (OH) de um resíduo de aminoácido. Ao ser fosforilada, a proteína alvo modifica sua natureza química, altera sua conformação e seus aminoácidos fosforilados se ligam a moléculas capazes de interagir com outras cadeias polipeptídicas e, que juntas, podem formar um complexo proteico (Alberts et al., 2007). A ativação e desativação das quinases pode ocorrer através do evento de autofosforilação ou por ligação de ativadores e inibidores. Cerca de 30% de todas as proteínas humanas são modificadas pela sua atividade catalítica, demonstrando a direta atuação dessas moléculas na regulação de inúmeras vias de sinalização, sobretudo, aquelas envolvidas na transdução de sinais (Hunter, 2000; McCance & Huether, 2014; Roskoski, 2012).

A família das proteínas quinases humanas apresenta 538 enzimas e estas podem transferir os fosfatos terminais do ATP para resíduos treonina (Thr), serina (Ser) ou tirosina (Tyr) (Manning et al., 2002). Muitas dessas proteínas atuam como serina/treonina quinases (PSTK), outras apenas como tirosina quinase (PTK) e as demais atuam sobre os três resíduos (PDSKs) (Miller et al., 2008). Essa multiplicidade enzimática faz com que sejam definidas como a maior classe de proteínas nos eucariotos e, extensivamente, que a fosforilação desencadeada por elas favoreça os mais diferentes processos celulares, como é o caso da síntese proteica, crescimento e migração celular, bem como a divisão das células, dentre outros (McCance & Huether, 2014).

Alvos desse estudo, as PTKs foram categorizadas nessa classe enzimática pela descoberta de uma proteína viral denominada sarcoma quinase viral (v-Src), homologa ao proto-oncogene c-Src encontrada nos vertebrados (Collett & Erikson, 1978; Parker et al., 1981). Posteriormente, as PTKs foram classificadas como tirosina quinases receptoras, definidas como proteínas transmembranares ativadas por um ligante extracelular, e tirosina quinases não receptoras citoplasmáticas que podem ser reguladas por mecanismos diversos (Silva et al., 2009). A FAK, outro membro pertencente ao grupo das PTKs, foi descrita atuando em diversos processos celulares fisiológicos e patológicos (Gabarra-Niecko et al., 2003; revisto por Franchini, 2012; Schaller, 2010; Xie et al., 2018) e, especificamente, neste estudo será considerada sua atuação na resposta hipertrófica cardíaca.

FAK, uma proteína de massa molecular de 125 kDa, foi primeiramente encontrada associada ao oncogene v-Src e, simultaneamente, identificada em sítios de FA (Schaller et al., 1992; Hanks et al., 1992; Kornberg et al., 1992). FAK desempenha importante papel biológico e regula ativamente os processos de proliferação, sobrevivência, migração celular, sendo ainda essencial para a fisiologia do coração, uma vez que atua em cascatas de sinalização e na contração da musculatura cardíaca (Cox et al., 2006; Hirth et al., 2016; Mitra et al., 2005; revisto por Martínez et al., 2020). Neste contexto, estudos demonstraram que camundongos deficientes na expressão de FAK no miocárdio, apresentaram parede ventricular delgada, bem como defeitos no septo ventricular e, ainda, em casos mais críticos a deleção dessa proteína acarreta a morte de embriões, o que corrobora a atuação de FAK durante o desenvolvimento cardiovascular (Furuta et al., 1995; revisto por Mohanty & Bhatnagar, 2019; Peng et al., 2008; revisto por Franchini, 2012). Ainda, FAK tem sido destacada como molécula protagonista da hipertrofia, fibrose e insuficiência cardíaca em resposta ao estresse biomecânico evidenciado durante a cardiomiopatia idiopática (Samarel, et al. 2014; Torsoni et al., 2003).

A estrutura de FAK é altamente conservada em humanos e camundongos e apresenta três domínios principais que incluem: o domínio N-terminal (FERM), um domínio central catalítico para atividade tirosina quinase e o domínio C-terminal que engloba uma região rica em prolina que antecede a região FAT (Parsons, 2003; revisto por Murphy et al., 2016) (**Figura 10**). O domínio FERM é

composto por um multidomínio proteico formado pelas proteínas banda 4.1, ezrina, radixina, moesina, e é caracterizado por apresentar três subdomínios distintos (F1, F2 e F3) (Ceccarelli et al., 2006), além de uma sequência de localização nuclear conservada (NLS) que permite que FAK desempenhe múltiplas funções e regule diversas proteínas no ambiente intracelular (Ossovskaya et al., 2008).

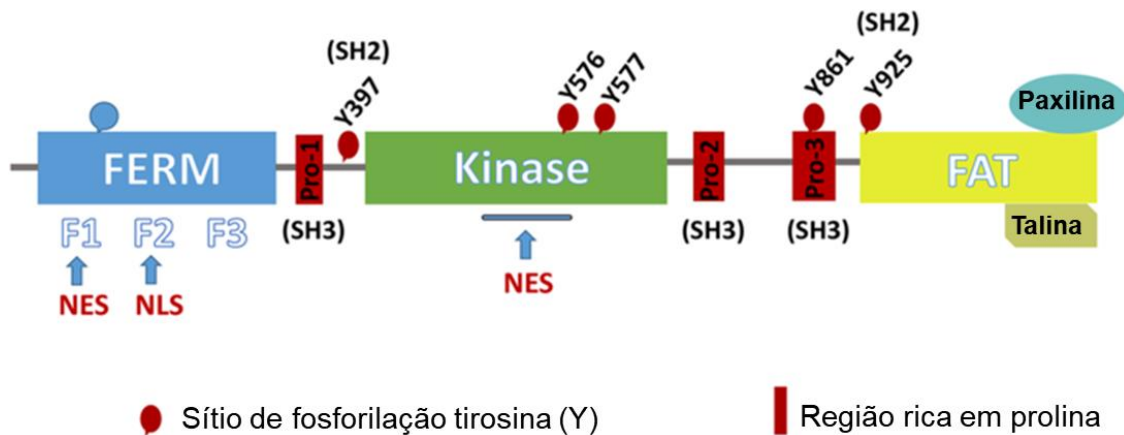


Figura 10: Estrutura molecular de FAK e os sítios de fosforilação tirosina. Esquema representativo dos três domínios encontrados na molécula (FERM, quinase e FAT) e do sítio de autofosforilação (Y397) e ativação (Y576 e Y577) da FAK. A presença dos subdomínios (F1, F2 e F3) da região FERM e uma sequência de localização nuclear (NLS) e outra sequência de exportação nuclear (NES) são identificadas nas regiões N-terminal e central catalítica da molécula, respectivamente. Observe que a ligação estabelecida entre as proteínas de adesão focal, talina e paxilina, com FAK ocorre via região FAT (Adaptado de Zhou et al., 2019).

Além disso, a região FERM interage com receptores transmembrana (**Figura 11**), como é o caso da cauda citoplasmática de β -integrina, receptores ligados a proteína G, receptores de fatores de crescimento, de proteoglicanos de heparan sulfato e de citocinas (revisado por Murphy et al., 2016; Wilcox-Adelman et al., 2002). Após ativação desses receptores, o resíduo tirosina 397 (Y397), posicionado entre a região N-terminal e o domínio central da molécula de FAK, se autofosforila (**Figuras 10 e 11**) (Cooper et al., 2003; Schaller et al., 1994) acarretando mudanças conformacionais que expõem novos resíduos para fosforilação, incluindo o sítio de ligação para o domínio SH2 da proteína Src (Schaller et al., 1994). A ligação de Src amplifica a atividade catalítica de FAK através da fosforilação dos seus resíduos centrais catalíticos Y576 (Tyr 576) e Y577 (Tyr 577) (Calalb et al., 1995; revisado por Franchini, 2012; revisado por Murphy et al., 2016; revisado por Martínez et al., 2020). A ativação de FAK

geralmente ocorre em sítios de adesão celular contendo agrupamentos de integrinas, que atuam como verdadeiras pontes de comunicação entre os componentes do meio extracelular e as proteínas do citoesqueleto (Mohanty & Bhatnagar, 2016). Na região FAT (“*Focal adhesion targeting*”) ocorre a ligação com as proteínas de FA, talina e paxilina, e a sua região precedente, rica em prolina, se liga a domínios SH3 de diferentes proteínas quinases (Lal et al., 2009; Parsons, 2003; Schaller et al., 1994). O recrutamento e ativação dessas moléculas se mostra fundamental para disparar as vias de sinalizações subsequentes e, deste modo, coordenar múltiplos eventos celulares (Kleinschmidt & Schlaepfer, 2017). Contudo, o controle da atividade de FAK também se faz necessário e sua auto inibição ocorre de forma precisa através do domínio não catalítico chamado FRNK, que atua como importante regulador negativo sobre suas propriedades catalíticas que favorecem, dentre variadas funções, a adesão e migração celular (Gervais et al., 1998; Lietha et al., 2007; Lal et al., 2009).

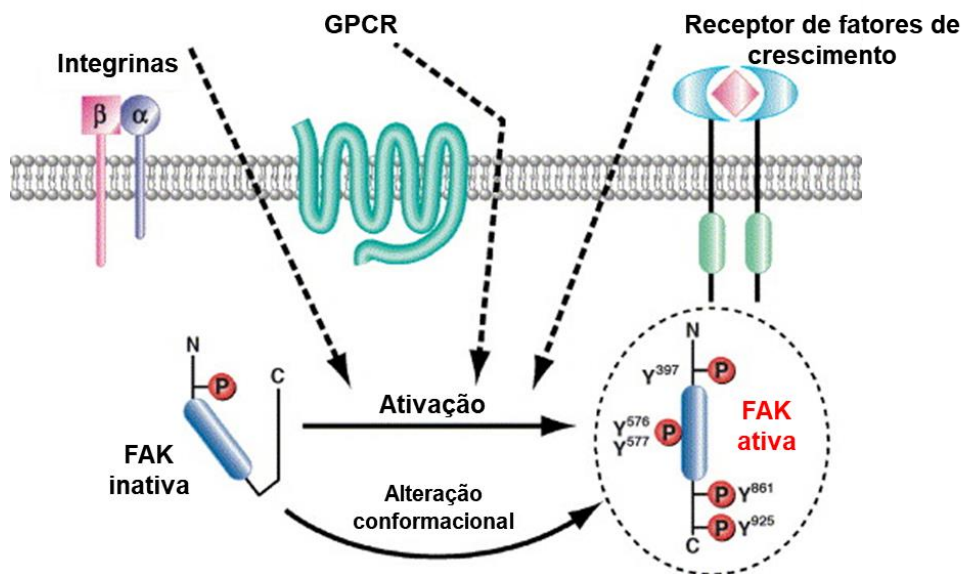


Figura 11: A interação de FAK com diferentes receptores de membrana – integrinas, GPCR e receptores de fatores de crescimento – acarreta sua autoativação através da fosforilação de seu resíduo Y-397. Após ativação, FAK sofre mudanças conformacionais e expõe outros resíduos de tirosina que, em associação com Src (não representada nesse esquema), ampliam a atividade catalítica de FAK (Adaptado de Schlaepfer et al., 2004).

FAK é reconhecida como um importante agente regulador da homeostase tecidual e como molécula chave em diversas patologias, incluindo doenças

cardiovasculares, onde essa proteína atua como efetora em cascatas de sinalização envolvidas na progressão da hipertrofia e da insuficiência cardíaca (revisto por Murphy et al., 2016). Em condições de sobrecarga hemodinâmica, o coração inicia uma resposta hipertrófica, onde múltiplas vias de sinalização são ativadas, culminando com o aumento da expressão de isoformas fetais de proteínas contráteis, assim como de ANP, da enzima conversora da angiotensina I e de tecido conjuntivo intersticial (revisto por Franchini, 2012; Nadruz Jr et al., 2005). O aumento na produção dessas proteínas é marcante durante a patogênese cardíaca e diversos achados apontam a FAK como molécula moduladora do crescimento hipertrófico de cardiomiócitos (Cardoso et al., 2016; Eble et al., 2000; revisto por Franchini, 2012; Torsoni et al., 2003).

A participação de FAK na hipertrofia cardíaca tem sido amplamente estudada e o aumento da sua atividade relatada em miócitos cardíacos murinos e humanos com o fenótipo hipertrófico (Clemente et al., 2007; revisto por Franchini, 2012; Lopes et al., 2007; Mohanty & Bhatnagar, 2017). Análises adicionais do perfil de expressão gênica e mutações em linhagem germinativa também reforçaram o papel de FAK na patogênese da hipertrofia cardíaca (Nadruz et al., 2005; Yamamoto et al., 2001; Mohanty & Bhatnagar, 2016). Além disso, dados revelaram que o silenciamento de FAK reduz a fibrose tecidual e apontam o papel crucial dessa quinase na fibrogênese miocárdica nos mecanismos de sobrecarga cardíaca crônica (Clemente et al., 2007; Iwanaga et al., 2002; Humeres & Frangogiannis, 2019; Zhang et al., 2017). O cenário hipertrófico e fibrótico relatados ocorre devido à síntese elevada de fibronectina, ET-1 e/ou AngII nas células musculares cardíacas. Notavelmente, o aumento nos níveis dessas proteínas ativa FAK e proteínas efetoras da família MAPK, tais como ERK1/2 e Jun N-terminal quinase (JNK) (Mohanty & Bhatnagar, 2016; Yamamoto et al., 2001).

Sabe-se que a atuação de FAK na mecanotransdução é dependente da fosforilação de seus resíduos tirosina e serina, de modo a modular sua interação com proteínas adaptadoras e aumentar sua atividade quinase (revisto por Samarel, 2014). Logo, sob estímulo de estresse mecânico, como por exemplo em condições de sobrecarga cardíaca, FAK é autofosforilada na posição Y397, mediante ativação por integrinas, e como resultado é ampliada sua afinidade de ligação com o domínio SH2 das proteínas Src quinase, como previamente

descrito. Após ligação à FAK, Src fosforila os sítios tirosina presentes no domínio catalítico e na sua região FAT (Y861 e Y925). O resíduo Y925 fosforilado se liga a proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento (Grb2) com domínio de homologia a Src 2 (SH2), que resulta na ativação de MAPK (Frame et al., 2010; revisto por Mohanty & Bhatnagar, 2019; revisto por Samarel, 2014; Schlaepfer et al., 1994). Concomitantemente, a autofosforilação no resíduo Y397 medeia a interação de FAK com a subunidade p85 de PI3K que ativa a cascata AKT e, em seguida, à proteína alvo da rapamicina de mamíferos (mTOR) em um mecanismo pró-hipertrófico nos miócitos cardíacos (**Figura 12**) (Franchini et al., 2000; Marin et al., 2008; revisto por Franchini, 2012). Além disso, é descrito que a proteína ADAM23 atua como molécula supressora dos processos hipertróficos e fibróticos cardíacos através do bloqueio da cascata sinalizadora de FAK/AKT (Xiang et al., 2018) e ainda, que a ativação de c-Jun (JNK), como via disparada na sinalização de FAK, é um importante fator regulatório da expressão gênica de ANP em eventos de estresse cardíaco (Nadrusz et al., 2005; revisto por Franchini, 2012). Evidências demonstraram que FAK também pode ser exportada para o núcleo em cardiomiócitos sujeitos à sobrecarga biomecânica, onde se liga via FAT ao fator 2 de aumento de miócito (MEF2). Esse acoplamento regula positivamente a atividade transcricional do MEF2 e coordena a transcrição de genes da proteína c-Jun, modulando a resposta dos miócitos ao estresse miocárdico (Cardoso et al., 2016).

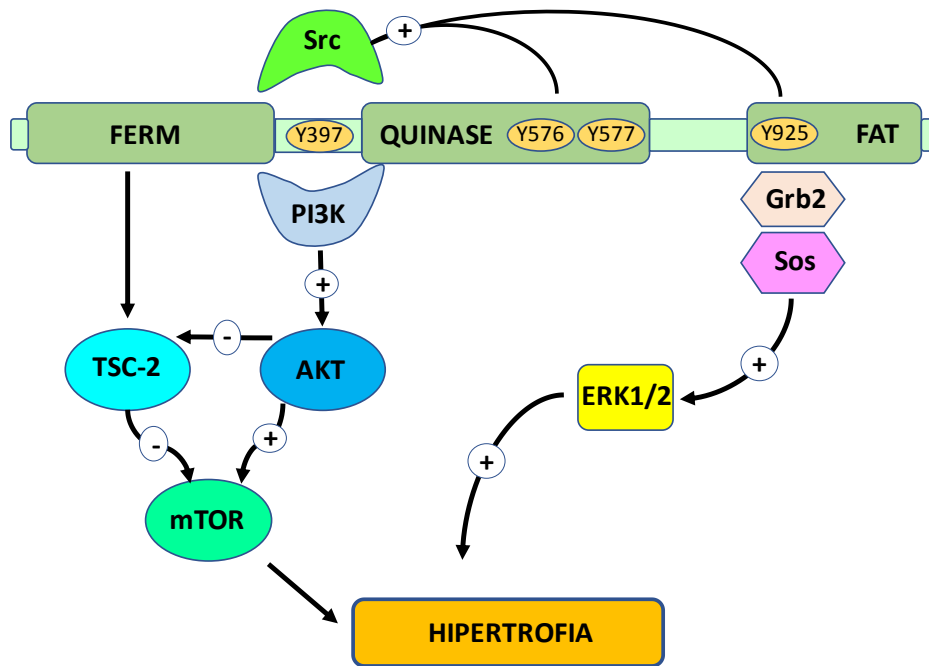


Figura 12: Ativação de FAK na hipertrofia cardíaca. A ativação mediada por integrina pode disparar as cascatas de sinalização FAK/PI3K/AKT/mTOR e FAK/Grb2/ ERK1/2 levando ao aumento da transcrição de genes hipertróficos. Observe que a interação entre FAK e AKT inibe TSC-2 e atuam como regulador positivo de mTOR. (Adaptado de Franchini, 2012).

Além da fosforilação de resíduos tirosina, também são encontrados quatro sítios serina de fosforilação (S722, S843, S846 e S910) na região C-terminal de FAK (**Figura 13, A**) (Grigera et al., 2005). Estudos demonstraram que estímulos de agentes hipertróficos, incluindo ET-1, IGF-1, felinefrina e AngII, podem desencadear a fosforilação do resíduo serina 910 (S910) de FAK e que esse evento é crítico para a desorganização sarcomérica e resposta hipertrófica em células musculares cardíacas (Chu et al., 2010; 2011), sendo ET-1 o agente hipertrófico mais potente. Assim, para disparar este processo, ET-1 interage com o receptor ET_A e pode ativar FAK via fosforilação de S910 por diferentes vias de sinalização intracelulares, como a via da proteína quinase C delta (PKC δ) e c-Src, que ativam paralelamente as vias Raf-1/ MEK1/2 / ERK1/2 ou a cascata MEK5/ ERK5, culminando na resposta hipertrófica (**Figura 13, B**) (Chu et al., 2010; 2011). A ampla ativação de FAK desestabiliza a interação FAK-paxilina e favorece a ligação de Y925 com Grb2 (Chu et al., 2011; Mohanty & Bhatnagar, 2016; Vadali et al., 2007).

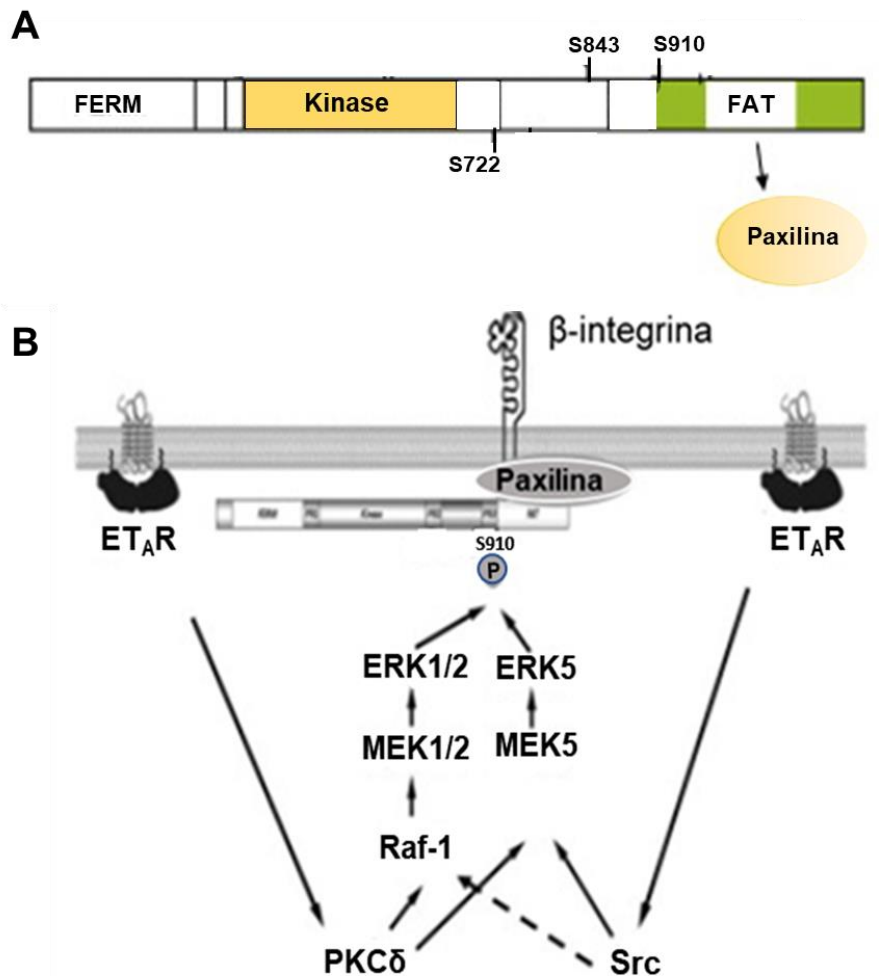


Figura 13: Resíduos serina de fosforilação (S910, S843 e S722) se situam na região FAT da molécula de FAK, sítio de interação com proteínas de adesão focal (A) (Adaptado de Rozengurt, 2012). A ligação de ET-1 ao receptor específico ET_A ativa proteína quinase C delta (PKC δ) e c-Src que, por vias independentes (Raf 1– MEK1/2 – ERK1/2; MEK5 – ERK5), promovem a fosforilação de FAK-S910 durante a hipertrofia cardíaca (B). (Adaptado de Chu et al., 2011).

Portanto, com base no conhecimento de que as vias de sinalização disparadas por ET-1, incluindo PI3K/AKT, mTOR, MAPK e FAK, e a sobrecarga miocárdica estão envolvidas na hipertrofia cardíaca idiopática (Bupha-Intr et al., 2012; Chu et al., 2011; revisto por Proud 2004) e ainda, que o efeito pró-hipertrofico de ET-1 também é observado na cardiomiopatia chagásica, se levantou questões sobre o papel de FAK na indução da resposta hipertrofica chagásica. Assim, este estudo visa elucidar as interações biomoleculares envolvidas no desencadeamento da hipertrofia cardíaca induzida por *T. cruzi*, uma vez que a identificação de vias de sinalização atuantes nesse processo poderá auxiliar em estratégias farmacológicas para a inibição deste evento.

II. JUSTIFICATIVA

A cardiomiopatia chagásica crônica, que atinge cerca de 30% dos pacientes cronicamente infectados, é considerada a maior causa de insuficiência cardíaca causada por agente infeccioso na América Latina. O cenário epidemiológico atual da doença reporta essa patologia como um importante problema de saúde pública global, em decorrência do intenso fluxo migratório dos indivíduos infectados da América Latina para os países não endêmicos. Esta doença silenciosa afeta aproximadamente 8 milhões de indivíduos no mundo, sendo responsável por 10.000 mortes ao ano. Uma grande problemática envolve o restrito acesso ao medicamento pela população mais carente, e ainda, a limitação da eficácia dos fármacos no estágio crônico da infecção. Embora o benzonidazol seja o fármaco de primeira escolha para o tratamento antiparasitário, sua atuação sobre o comprometimento cardíaco é limitada em pacientes com cardiomiopatia moderada a grave. Assim, se torna necessário o entendimento dos mecanismos biomoleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca, assim como a identificação de novos alvos terapêuticos para a reformulação de fármacos na pesquisa clínica. Sob este contexto, o presente trabalho teve como proposta identificar moléculas reguladoras da hipertrofia cardíaca na doença de Chagas, visando ampliar o conhecimento e identificar moléculas protagonistas deste evento biológico com potencial alvo terapêutico.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a participação de FAK e da proteína sinalizadora ERK1/2 no processo de hipertrofia cardíaca chagásica.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar as alterações eletrocardiográficas e sua evolução temporal no modelo murino de infecção experimental por *T. cruzi* cepa Brasil;

3.2.2. Avaliar os níveis plasmáticos de endotelina-1 e sua correlação com a modulação da via de sinalização de FAK na infecção experimental por *T. cruzi* in vivo;

3.2.3. Analisar se há envolvimento da via de sinalização de FAK, incluindo a via interligada de ERK1/2, no fenótipo hipertrófico da infecção experimental por *T. cruzi* in vivo;

3.2.4. Avaliar se há correlação entre os níveis de expressão do gene associado à hipertrofia cardíaca com alterações do órgão nas fases aguda e crônica da infecção por *T. cruzi*;

3.2.5. Avaliar a expressão de componentes de matriz extracelular e sua correlação com a sobrecarga cardíaca modulando a via de sinalização de FAK.

MATERIAIS

e

MÉTODOS

IV. MATERIAIS & MÉTODOS

4.1. Infecção experimental por *T. cruzi*

Camundongos C57BL/6 machos (18–20g), obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, Fiocruz), foram alojados em grupos de 5 animais por gaiola padrão e mantidos em estantes ventiladas com controle de temperatura (20 – 22 °C) e umidade (50 a 60%), ciclo claro/escuro (12-12h) e com fornecimento de água e ração esterilizadas *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais experimentais foram realizados de acordo com a Lei 11.794 / 2008 e aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais experimentais do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz (licença L15/2017).

Um total de 42 camundongos foram divididos em 2 grupos: animais não infectados (12) e infectados por *T. cruzi* (30). Cada animal foi infectado intraperitonealmente com 1×10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Brasil, enquanto os indivíduos controle não infectados foram inoculados com solução estéril de salina tamponada com fosfato (PBS). A carga parasitária foi monitorada diariamente do 5º ao 20º dia pós infecção (dpi) seguido de avaliação em dias alternados (2 ou 5 dias) até 50 dpi pelo método de Pizzi-Brener (Brener, 1962). Brevemente, após contenção do animal em recipiente apropriado, uma pequena incisão foi realizada na extremidade de sua cauda e o sangue fresco (5 µL) foi coletado e observado diretamente ao microscópio óptico para determinação da parasitemia. A cinética de infecção experimental foi avaliada nos intervalos de 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dpi. Nos tempos determinados, um grupo de 4-5 camundongos (não-infectados e infectados) foram avaliados quanto ao perfil eletrocardiográfico (procedimento detalhado no item 4.2) e, em seguida, submetidos à eutanásia por inalação de CO₂ seguido de remoção do coração. O tecido cardíaco foi seccionado longitudinalmente e metade do material criopreservado em Tissue-Tek (O.C.T.) para imuno-histoquímica e a outra porção tecidual fragmentada e processada para extração de RNA e proteínas. Dois ensaios independentes foram realizados.

4.2. Análise eletrocardiográfica (ECG)

Os parâmetros eletrocardiográficos (ECG) foram avaliados em camundongos não sedados pelo uso de transdutores cuidadosamente colocados sob a pele, de acordo com uma derivação preferencial escolhida (DII). Os traços eletrocardiográficos foram gravados com um sistema digital (Power Lab 2/20) conectado a um bioamplificador a 2 mV por 1 s (PanLab Instruments). Os filtros foram padronizados entre 0,1 e 100 Hz e os traços foram analisados utilizando o Scope software para Windows V3.6.10 (PanLab Instruments). Foram medidos a frequência cardíaca e a duração dos intervalos PR, QRS, e QT em milissegundos (ms) através da onda P: (i) despolarização do nodo sinusal, (ii) intervalo PR: condução elétrica atrioventricular, (iii) intervalo QRS: despolarização ventricular, (iv) intervalo QT: repolarização cardíaca e (v) frequência cardíaca: batimentos cardíacos por minuto (bpm). Além disso, os traçados do ECG foram analisados qualitativamente, definindo se há alteração da frequência cardíaca (arritmias). As relações entre o intervalo QT e o intervalo RR foram avaliadas individualmente para obter valores relevantes fisiologicamente para a frequência cardíaca-intervalo QT corrigido (QTc), dando um intervalo RR normalizado ($RR100 = RR0 / 100 \text{ ms}$).

4.3. ELISA

Para avaliar a concentração plasmática de ET-1, o kit de ELISA Millipore Sigma-Aldrich (catálogo RAB1852) foi utilizado de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em uma placa de 96 poços, previamente recoberta com o anticorpo anti-ET-1, foram adicionados 100 μL /poço do plasma dos animais (controle ou infectados) e a curva padrão foi feita utilizando diferentes concentrações (25.000; 1.000; 333,33; 111,11; 37; 12,3; 4,11 pg/mL) de ET-1 purificada fornecida pelo kit. Em seguida, a placa foi incubada a 4 °C por 24 h sob agitação. Após incubação, a placa foi lavada 4 vezes com a solução de lavagem e incubada por 1 h a temperatura ambiente (TA) com 100 μL /poço do anticorpo de detecção conjugado à biotina. Posteriormente, foram realizadas sucessivas lavagens com tampão e 100 μL da solução de estreptavidina foram

adicionados em cada poço (45 minutos em TA). Em seguida, a placa foi incubada com o reagente colorimétrico TMB (30 minutos em TA), protegido da luz. Por fim, a reação foi encerrada com 50 µL da solução de parada e a leitura da absorbância das amostras foi obtida a 450 nm no leitor de microplacas Spectramax M2e (Molecular Devices). Todas as incubações foram realizadas sob agitação suave. O ensaio foi realizado com todas as amostras em duplicata.

4.4. Extração de proteínas e Western blotting

Os fragmentos de tecido cardíaco não infectados e infectados por *T. cruzi* foram extraídos com tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, pH 8,0) contendo inibidores de proteases (Sigma Chemical Co.; AEBSF– [4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoridehydrochloride, aprotinina, hidrocloreto de bestatina, E-64–[N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate salt, Pepstatin A) e fosfatases (Sigma Chemical Co.; Cantharidin, (–)-p-Bromolevamisole oxalate e Calyculin A). Uma alíquota do lisado celular (25 µL) foi separada para a realização da dosagem de proteínas segundo o método de Folin (Lowry et al., 1951) e no restante do extrato proteico foi adicionado tampão de amostra (62,5 mM Tris–HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,01% de azul de bromofenol; e 5% β-mercaptoetanol) que, subsequentemente, foi aquecido por 5 minutos a 100 °C em banho seco. A separação eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 10%, contendo SDS, e as amostras com 20 e 40 µg de proteínas totais, a depender do antígeno analisado e como indicado nas legendas das figuras, foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad, Hercules, CA). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas por 40 minutos com 5% de leite desnatado diluído em solução salina tamponada com tris (TBS) contendo 0,05% de Tween 20 (TBST) seguida de incubação por 12 horas (4 °C) com anticorpos específicos (anti-FAK e anti-ERK1 (1:1000) ou anti-fibronectina, 1:2500). Em contrapartida, as proteínas fosforiladas foram detectadas em solução consistindo de anticorpos primários (anti-FAK-Y397, anti-FAK-S910 ou anti-pERK1/2; 1:1000) diluídos em TBST contendo 1% de BSA. Após incubação de 12 horas a 4 °C, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:10000)

diluído em solução de bloqueio (TBST + 5% de leite) para posterior revelação por quimioluminescência (Super Signal) e exposição em hiperfilme (GE Healthcare). Todos os ensaios foram normalizados com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) utilizado como padrão interno. A análise densitométrica foi realizada pelo programa ImageJ.

4.5. Imunofluorescência indireta

As amostras de tecido cardíaco dos camundongos não infectados e infectados por *T. cruzi* foram congeladas em composto Tissue-Tek (O.C.T.) e estocadas em nitrogênio líquido. Os criocortes, obtidos no criostato Leica 1800, foram fixados em acetona -20 °C, secos ao ar e armazenados a -20 °C. Os cortes foram lavados em PBS e bloqueados por 3 incubações de 10 min cada a TA com PBS contendo 4% de albumina de soro bovino (PBS+BSA; BSA). Em seguida, as amostras foram incubadas por 12 horas a 4 °C com o anticorpo primário anti-fibronectina (1:600; Sigma Chemical Co., St Louis - USA) ou anti-colágeno tipo 1 (1:400; Life Technologies Co., Carlsbad, CA - USA) e, posteriormente, lavados em PBS+BSA 4%. O complexo antígeno-anticorpo foi detectado pela incubação por 1h a 37 °C com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao TRITC (1:400; Sigma). Para detecção do DNA, os criocortes foram incubados com 10 µg/mL de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), lavados em PBS e, em seguida, montadas em 2,5% de 1'4-diazabicyclo-(2.2.2)-octane (DABCO; Sigma) em PBS contendo 50% de glicerol e seladas com esmalte incolor. Os controles negativos foram preparados na ausência dos anticorpos primários específicos e as amostras foram observadas ao microscópio Zeiss Axio-Imager M2 equipado com sistema Apotome. As imagens foram adquiridas com o software de processamento de imagem digital AxioVision (Zeiss).

Para a análise de bioimagem de colágeno tipo I, o mínimo de cinco campos microscópicos distintos de cada grupo (controles e infectados) foi capturado com objetiva de 40X. As imagens de fluorescência foram segmentadas e a intensidade média medida através do programa Knime (Dietz & Berthold, 2016).

4.6. Extração de RNA e transcrição reversa

O RNA do tecido cardíaco de animais controle e infectados por *T. cruzi* (60 a 210 dpi) foi extraído com a combinação de TRIzol® (Invitrogen) e mini-kit RNeasy® (Qiagen). As amostras cardíacas (10 mg) foram imersas em 1 mL de TRIzol, estocadas em nitrogênio líquido para melhor preservação, descongeladas e homogeneizadas por 30 segundos com o homogeneizador de tecidos TissueRuptor (QIAGEN, USA) seguido de adição de 200 µL de clorofórmio. Após vigorosa agitação do material, a fase aquosa foi removida e transferida para outro microtubo, onde foi adicionado etanol absoluto de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA foi extraído desta mistura, utilizando o kit RNeasy (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante. Após a extração, o RNA foi mantido a -80 °C. A concentração de RNA total foi determinada medindo a absorvância a 260 nm e a pureza nas proporções 260/280 e 260/230 nm através de um espectrofotômetro Nanodrop®. Em seguida, 2 µg de RNA foram submetidos à transcrição reversa usando o Kit de síntese de cDNA SuperScript III (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração de cDNA foi medida utilizando o Qubit® ssDNA (Life Technologies) e ajustada para 10 ng/µL de concentração final.

4.7. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A expressão do gene do peptídeo natriurético atrial (ANP) foi comparada entre tecidos cardíacos não infectados e infectados por *T. cruzi* por RT-qPCR, utilizando o kit Power SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems). As sequências dos *primers* utilizados são demonstradas na **tabela 1**. As condições de ciclagem da PCR foram: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A quantificação relativa dos produtos amplificados foi calculada pelo método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) usando GAPDH e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) como genes de referência (Livak & Schmitz, 2001). As amplificações foram realizadas no equipamento ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems, USA). A diferença de expressão (fold change: $2^{-\Delta\Delta Ct}$) do RNAm foi comparada entre as amostras de

camundongos infectados e controles, sendo estes utilizados como calibradores. Para seleção de genes candidatos a referência e análise da expressão gênica, o programa Expression Suite Software v1.1 (Life Technologies) foi utilizado.

Tabela 1. Primers e parâmetros das curvas de validação do $\Delta\Delta C_t$, para os alvos endógenos e o marcador de hipertrofia cardíaca em camundongos C57BL/6 infectados por *Trypanosoma cruzi*.

Gene alvo	Sequência dos primers	Referência	Tamanho do amplicon	Inclinação	Intercepto	Coefficiente de linearidade (r^2)	Eficiência de amplificação (%)
GAPDH	Fw 5'-TCACCACCATGGAGAAGG-3' Rv 5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'	Ribeiro-Romão <i>et al.</i> , 2014	169 bp	-3,34	11,71	0,99	99,3
HPRT	Fw 5'- TCCCAGCGTCGTGATTAGCGATG-3' Rv 5'-GGCCACAATGTGATGGCCTCCC-3'	Barreto-Albuquerque, 2015	178 bp	-3,44	21,15	0,98	95,3
ANP	Fw 5'-GGATTTCAGAACCTGCTAGACC-3' Rv 5'-CGTCTCTCAGAGGTGGGTTG-3'	Este estudo	167 bp	-3,27	19,69	0,99	102,1

4.8. Análise estatística

A análise estatística e os gráficos foram realizados usando o R (versão 3.6.0) e o RStudio. Os dados foram analisados através da determinação da média \pm desvio padrão e foram comparados ao seu controle pelo teste *t-Student*. O valor $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Todos os ensaios de RT-qPCR foram realizados com triplicatas biológicas em dois experimentos independentes. Os testes estatísticos para os valores de ΔC_t (teste *t-Student* ou teste de Mann-Whitney rank-sum) foram realizados pelo programa Prisma GraphPad (GraphPad Software, versão 5.00).

RESULTADOS

V. RESULTADOS

5.1. Evolução das anormalidades eletrocardiográficas na infecção de modelo murino por *T. cruzi*

A insuficiência cardíaca é um importante parâmetro para análise da progressão da cardiomiopatia chagásica crônica. Neste estudo, o modelo murino C57BL/6 infectado com *T. cruzi* cepa Brasil foi utilizado para investigar a participação de FAK como via de sinalização reguladora da hipertrofia cardíaca. As condições do sistema de condução elétrica cardíaca dos animais não infectados (NI) e infectados por *T. cruzi* (INF) foram avaliadas por eletrocardiograma (ECG) durante a fase aguda e crônica da infecção experimental. A escolha deste modelo foi pautada na descrição prévia de cardiomiopatia crônica com manifestação eletrocardiográfica e hipertrofia evidenciada por ecocardiograma a partir de 100 dpi (Eickhoff et al., 2010; Jelicks & Tanowitz, 2011).

A carga parasitária foi acompanhada por monitoramento diário a partir de 5 dpi utilizando o método de Pizzi-Brener (Brener, 1962). Os camundongos C57BL/6 apresentaram um perfil de infecção irregular com níveis reduzidos de parasitos circulantes no sangue. O pico de parasitemia foi detectado em 26 dpi ($7 \times 10^4 \pm 5$ parasitos/mL) e a ausência detectável de parasitos circulantes por esse método foi observada a partir de 45 dpi (**Figura 14**). No entanto, na etapa de retirada dos órgãos, alguns animais em 60 dpi apresentaram parasitemia positiva.

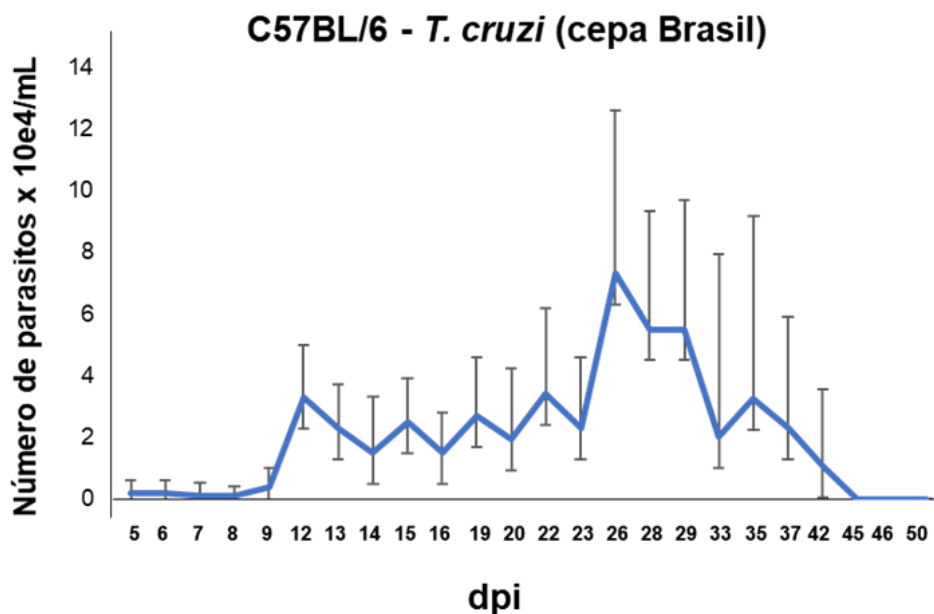


Figura 14: Curva de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi*, cepa Brasil. O monitoramento de parasitos circulantes no sangue foi iniciado a partir do 5º dpi e acompanhada até 90º dpi. O pico de parasitemia foi observado no 26º dpi e a ausência de parasitos circulantes detectáveis pelo método foi evidenciada após 45º dpi. A infecção foi feita com 10^5 parasitos por via intraperitoneal.

Todos os animais infectados apresentaram parasitemia positiva e progrediram para infecção crônica com ausência de mortalidade nos estágios iniciais de infecção (30 – 60 dpi). Anormalidades nos traços eletrocardiográficos foram identificadas nos grupos de animais infectados comparado aos animais controle. Alterações importantes foram observadas na condução elétrica entre átrios e ventrículos, resultando em prolongamento do intervalo PR (**Figura 15**). Um aumento significativo na duração do intervalo PR ($p \leq 0,05$) foi evidenciado nos grupos de animais infectados (INF; $43,7 \pm 10,2$ ms) comparado aos animais controle (NI; $37,1 \pm 5,0$ ms), demonstrando um atraso na condução desde o nó sinusal até o ventrículo (**Figura 15**). Não foi observada redução estatisticamente significativa na frequência cardíaca (bradicardia sinusal - BRA) entre os grupos infectados (598 ± 140 bpm) e não infectados (627 ± 42 bpm). No entanto, a análise individual dos grupos infectados demonstrou BRA em 50% dos animais em 180 dpi (**Figura 16**). Os demais parâmetros, como onda P (despolarização atrial), intervalo QRS (despolarização ventricular) e intervalo QT (despolarização e repolarização ventricular), também não demonstraram diferença significativa no modelo C57BL/6 não infectado e infectado por *T. cruzi* (**Figura 15**).

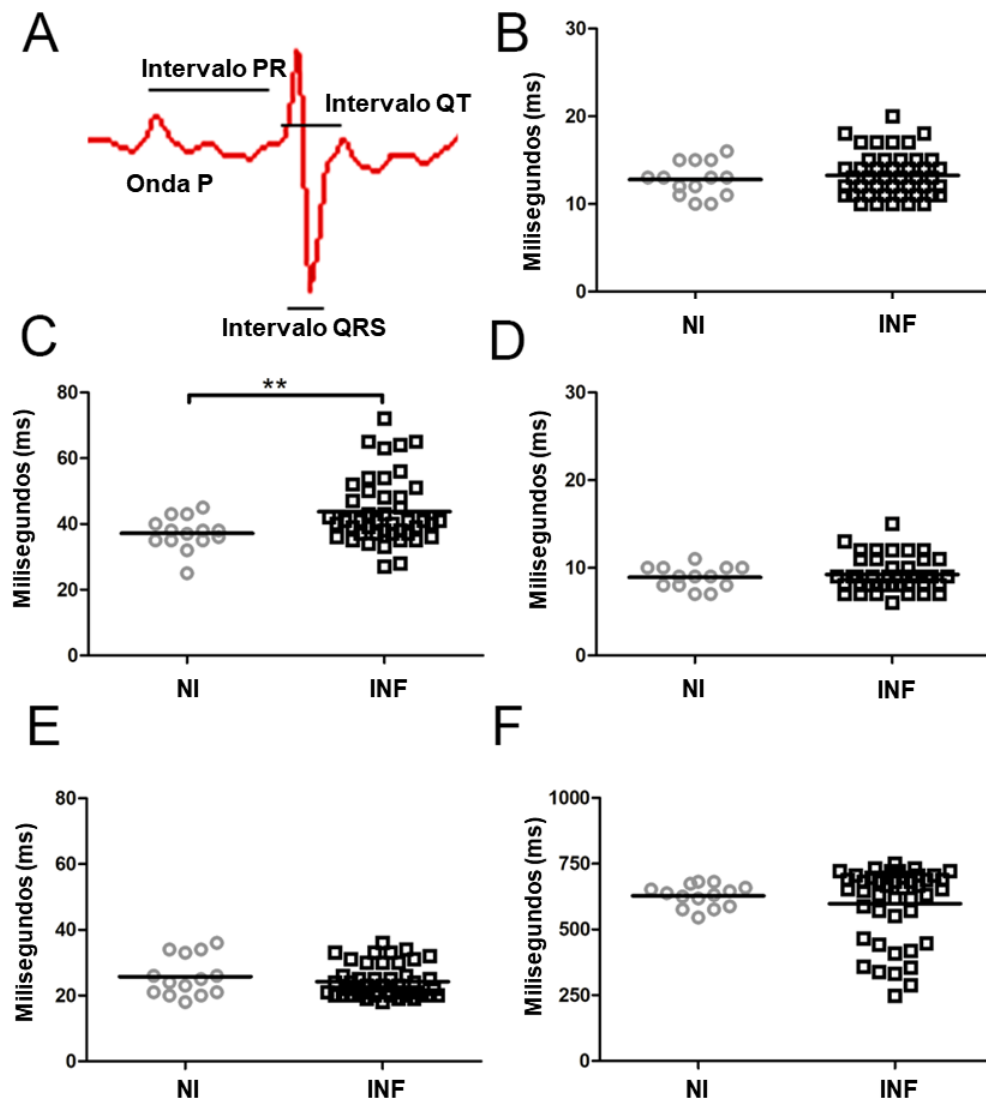


Figura 15: Análise do sistema de condução elétrica em C57BL/6 não infectados (NI: círculos) e infectados por *T. cruzi* (INF: quadrados). Esquema representativo dos impulsos elétricos cardíacos demonstrando a condução atrial (onda P), condução elétrica atrioventricular (intervalo PR), a despolarização ventricular (intervalo QRS) e repolarização cardíaca (QT_c) (A). Aumento significativo do tempo de condução elétrica pelo nodo atrioventricular foi observado pelo intervalo PR (C). Análise da onda P (B), dos intervalos QRS (D) e QT_c (E), bem como da frequência cardíaca (F) não apresentaram diferenças significativas durante a infecção, revelando que os demais parâmetros eletrocardiográficos permanecem similares aos encontrados no grupo controle. Teste *t* Student: ** $p < 0.01$.

A avaliação dos parâmetros elétricos cardíacos no período estudado demonstrou aumento gradual no perfil de arritmias. Na infecção aguda (60 dpi), a incidência de arritmias cardíacas foi menos prevalente, ocorrendo em apenas 20% dos animais infectados. Com a progressão da doença, a elevada incidência de arritmias se tornou predominante, alcançando índices de 50% e 67% dos

camundongos infectados entre 120 e 180 dpi. Vale ressaltar ainda, que a ocorrência de bloqueio atrioventricular (BAV) e bradicardia (BRA) foram majoritários com níveis elevados nos estágios mais tardios de infecção, mas eventos de arritmia sinusal (ART; 33%) e extrassístole ventricular (EV; 17%) também foram evidenciados (**Figura 16**).

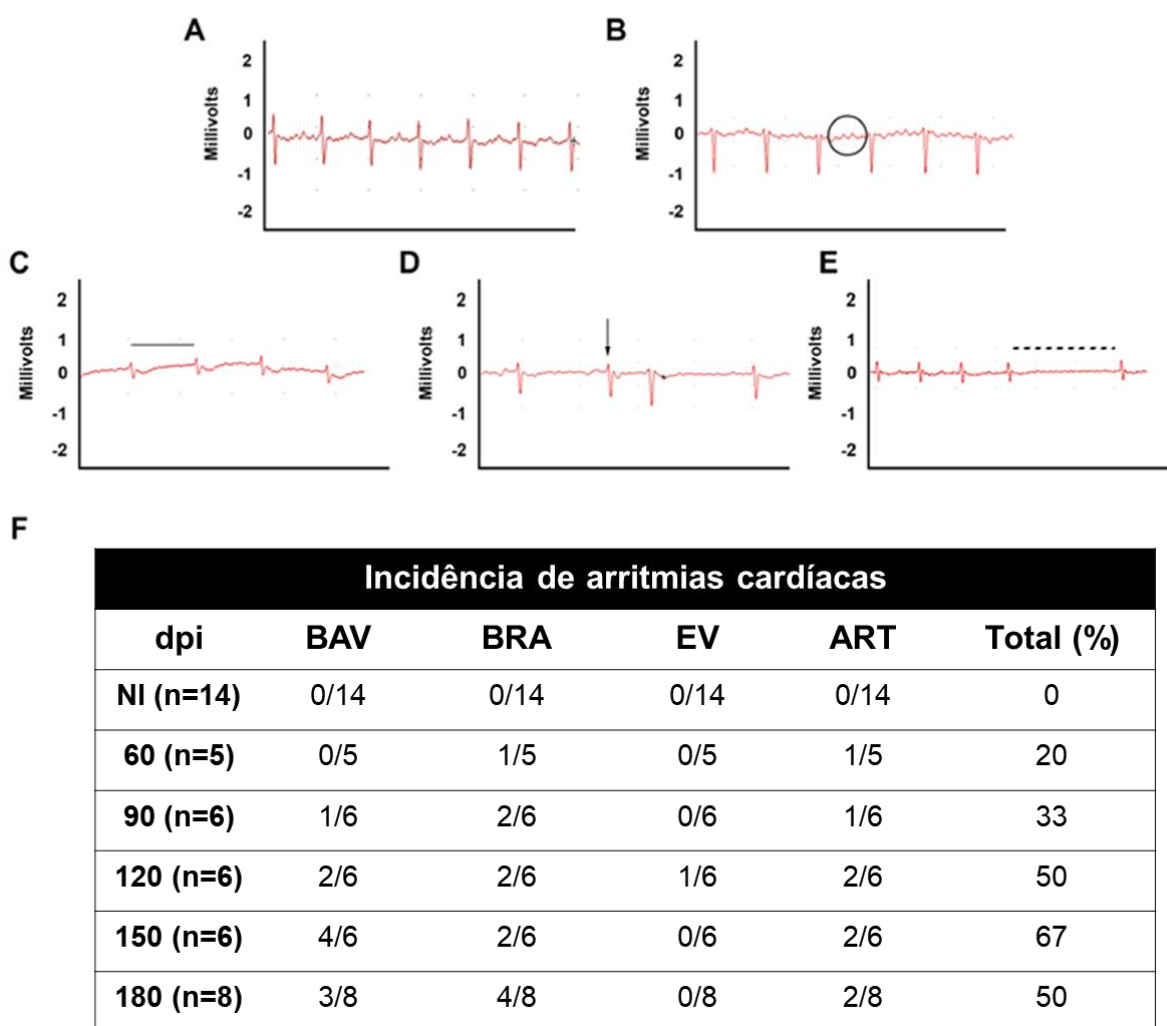


Figura 16: Análise eletrocardiográfica durante infecção experimental por *T. cruzi* (cepa Brasil) em modelo murino. É mostrado um traçado eletrocardiográfico representativo de (A) camundongos controle e (B) animais infectados por *T. cruzi* com bloqueio atrioventricular (BAV; círculo), (C) bradicardia sinusal (BRA; linha contínua), (D) extrassístole ventricular (EV; seta) e (E) arritmia sinusal (ART; linha tracejada). Os dados quantitativos demonstraram elevada incidência de arritmias cardíacas nos animais cronicamente infectados quando comparados com aqueles de fase aguda. As alterações ECG foram intensificadas após 120 dpi sendo observado o aumento percentual nos eventos de BRA, ART e BAV durante o estágio crônico da doença. NI: não infectado.

5.2. Níveis plasmáticos de ET-1 e indução da ativação de FAK na infecção por *T. cruzi*

ET-1 desempenha importante papel na patogenia da DC, atuando como agente hipertrófico modulador de vias de sinalização envolvidas na hipertrofia cardíaca chagásica (Corral et al., 2013; Rigazio et al., 2014). Além disso, seu relevante papel na ativação de FAK, via reguladora da hipertrofia cardíaca idiopática (Chu et al., 2010), levantou o questionamento se a modulação positiva de ET-1 poderia estar relacionada com o disparo da via de sinalização de FAK induzindo fenótipo hipertrófico na infecção por *T. cruzi*. Assim, diante das alterações ECG indicativas de insuficiência cardíaca, os níveis plasmáticos de ET-1 foram avaliados por ensaio imunoenzimático (ELISA) durante a infecção experimental (60 – 210 dpi). Elevada concentração plasmática de ET-1 foi observada tanto na fase aguda (60 dpi) quanto na fase crônica de infecção (90 – 210 dpi). O nível basal de ET-1 no grupo de animais controle atingiu a concentração plasmática de 1,3 $\mu\text{mol/mL}$. Um aumento significativo nos níveis plasmáticos de ET-1 foi observado desde o 60 dpi (2,3 $\mu\text{mol/mL}$) até o 180 dpi (2,05 $\mu\text{mol/mL}$). No entanto, a maior concentração plasmática foi evidenciada em 120 dpi (4,5 $\mu\text{mol/mL}$), alcançando níveis 3,4 vezes maiores que o grupo de animais não infectados (1,3 $\mu\text{mol/mL}$), seguido de 90 dpi (3,74 $\mu\text{mol/mL}$) e 150 dpi (3,9 $\mu\text{mol/mL}$) (**Figura 17**).

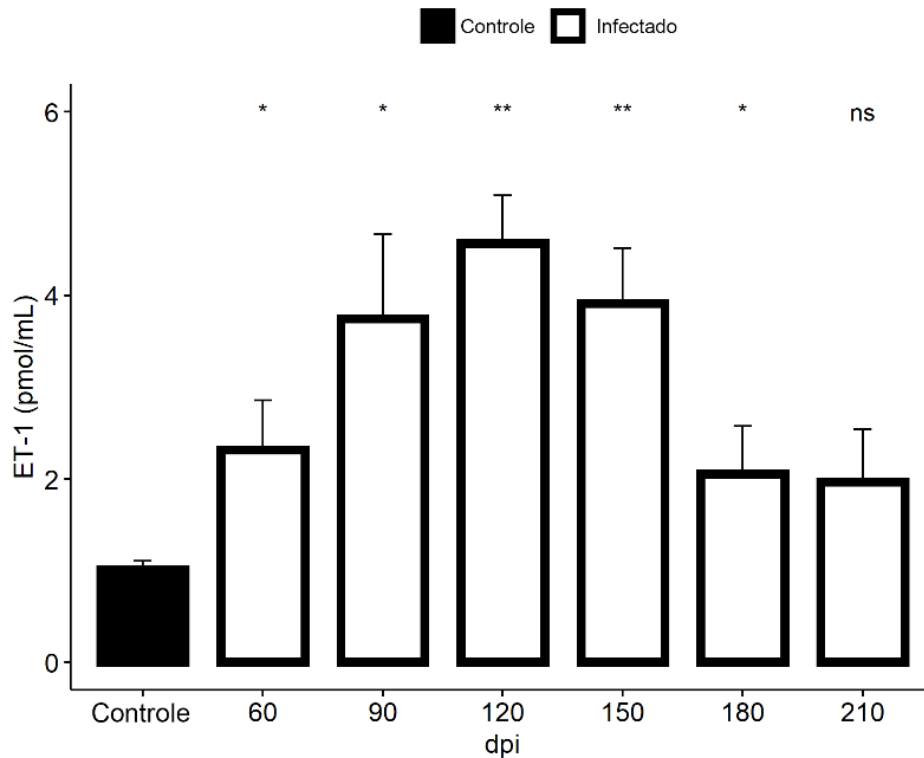


Figura 17: Níveis plasmáticos de ET-1 na infecção experimental por *T. cruzi* em modelo murino. Elevada expressão de ET-1 plasmática foi observada nas fases aguda (60 dpi) e crônica (90 - 210 dpi) de infecção por *T. cruzi*. Camundongos infectados exibiram concentrações crescentes de ET-1 até os estágios mais tardios da infecção, com pico de produção sendo atingido em 120 dpi (4.5 pmol/mL). Os níveis de ET-1 foram expressos como média (\pm erro padrão da média) em pM no plasma de C57BL/6 infectados e não infectados, e a análise estatística de cada dpi foi obtida em comparação ao grupo controle. Teste *t* Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Assim, uma questão em aberto foi se o elevado nível plasmático de ET-1 e a sobrecarga cardíaca seriam capazes de estimular a ativação da via de sinalização de FAK, uma vez que essa proteína foi reconhecida como importante reguladora dos eventos de estresse e alongamento de miócitos cardíacos. Inicialmente, a ativação de FAK no tecido cardíaco foi avaliada através de sua autofosforilação, ou seja, fosforilação de seu resíduo Y397. Observamos que a infecção crônica por *T. cruzi* induziu ativação de FAK, mas não acarretou alteração na expressão de FAK total. Um aumento significativo na fosforilação de Y397 foi evidenciado a partir de 90 dpi ($0,9 \pm 0,2$) até 180 dpi ($0,7 \pm 0,09$), com pico de ativação alcançado em 120 dpi ($1,04 \pm 0,3$), demonstrando um aumento de 3,4 vezes dos níveis de autofosforilação quando comparado ao grupo controle ($0,3 \pm 0,07$) (**Figura 18**). Uma vez evidenciada a ativação de FAK,

o perfil de fosforilação de seu resíduo serina 910 (S910) também foi avaliado no curso da infecção experimental. Interessantemente, níveis elevados de fosforilação de S910 foram observados a partir de 120 dpi ($1,0 \pm 0,1$) coincidente com o pico de expressão plasmática de ET-1. Níveis máximos de fosforilação de S910 foram evidenciados em 180 dpi ($1,12 \pm 0,2$), representando um aumento de 3,6 vezes em comparação com os camundongos não infectados, que apresentaram níveis basais de fosforilação dessa PTK ($0,3 \pm 0,08$) (**Figura 18**). Vale ressaltar que a ativação de FAK, tanto em seu resíduo tirosina (Y397) quanto serina (S910), ocorreu apenas na infecção crônica embora os níveis de ET-1 já estivessem elevados ao término da infecção aguda (60 dpi) (**Figura 17**). Destaca-se ainda, que a autoativação de FAK antecede a intensificação de incidência de arritmias cardíacas em C57BL/6 cronicamente infectados (**Figuras 16 e 18**).

A associação das vias de sinalização de FAK com a proteína quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) no disparo da cardiomiopatia idiopática, levou ao questionamento sobre o envolvimento destas vias na hipertrófica chagásica. Assim, a expressão de ERK1 total e o perfil de fosforilação de ERK1/2 também foi avaliado na infecção por *T. cruzi*. A expressão de ERK1 total se manteve inalterada durante a infecção aguda e crônica, com exceção dos animais no 210 dpi, que apresentaram declínio nos níveis de ERK1 (**Figura 18**). Em contrapartida, a elevação dos níveis de ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) foi evidenciada ao longo de todo o curso da infecção experimental avaliada (60 - 210 dpi). A máxima ativação de ERK1/2 foi detectada em 180 dpi ($4,7 \pm 0,7$), sendo, curiosamente, o pico de ativação de FAK-S910 (**Figura 18**). Destaca-se ainda, que a ativação de ERK1/2 antecede a ativação de FAK-S910, contudo, coincide com a elevação do nível plasmático de ET-1.

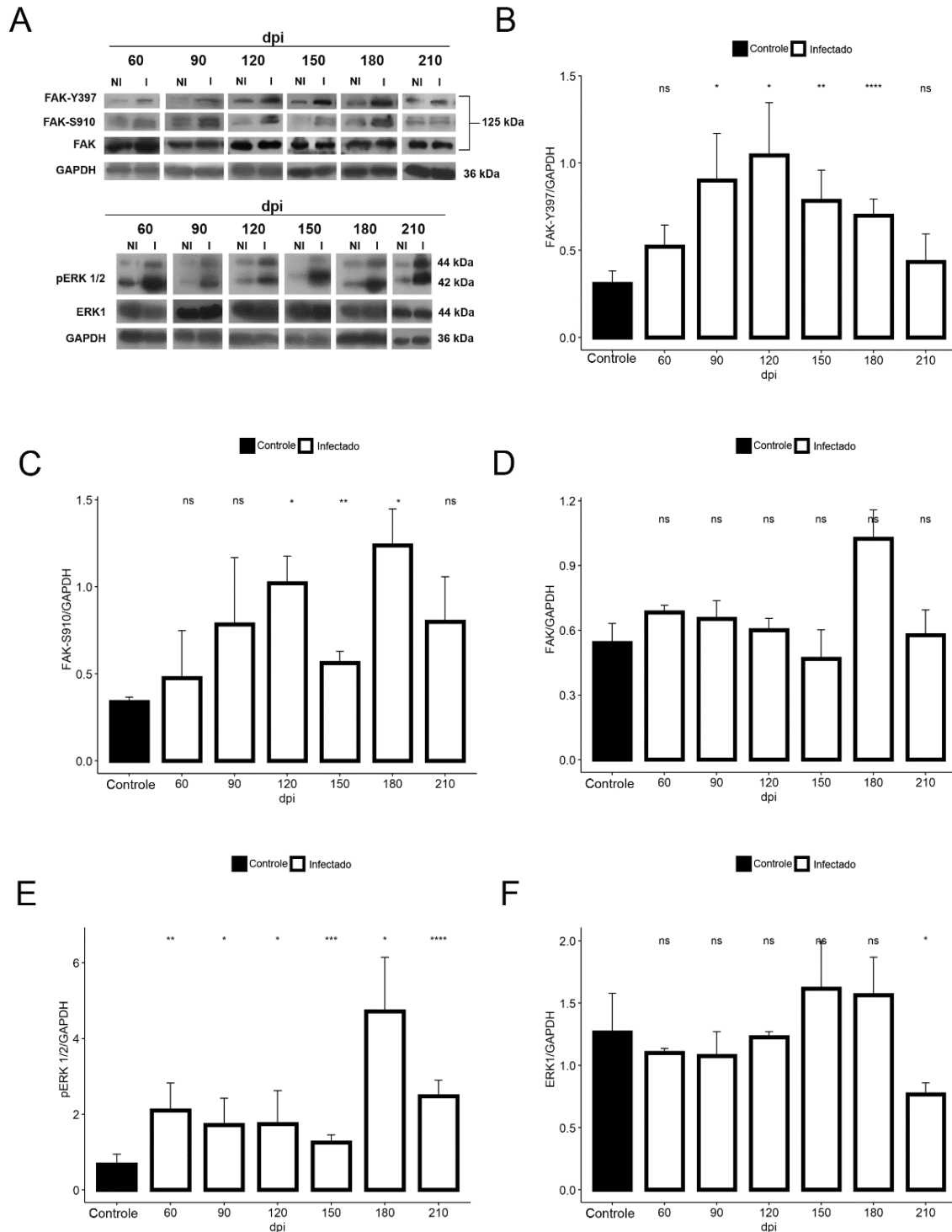


Figura 18: Ativação das vias de FAK e ERK1/2 na infecção de C57BL/6 por *T. cruzi*, cepa Brasil. (A) Imagem representativa de *imunoblot* de FAK-Y397, FAK-S910, FAK total, pERK1/2 e ERK1 total em tecido cardíaco de animais controle e infectados por *T. cruzi*. Os dados quantitativos revelaram aumento de 3,4 vezes dos níveis de autofosforilação de FAK-Y397 em 120 dpi em comparação com o grupo não infectado (B). Níveis mais elevados de ativação de FAK-S910 também foram detectados a partir de 120 (C), sem alteração na expressão de FAK total (D). Note os níveis mais elevados de fosforilação de ERK1/2 (pERK1/2) durante cinética de infecção por *T. cruzi* (E) enquanto o perfil de expressão de ERK1 total permaneceu inalterado, exceto em 210 dpi (F). Os ensaios foram normalizados com GAPDH utilizado como controle interno. Teste *t* Student: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

5.3. Indução de gene hipertrófico na infecção por *T. cruzi*

Reconhecendo a integração das vias de FAK e ERK1/2 no disparo da hipertrofia miocárdica, mediante estímulo de ET-1, nesta etapa foram avaliados os níveis de RNAm do peptídeo natriurético atrial (ANP), um biomarcador de hipertrofia cardíaca. Para esta análise foi realizada a técnica de RT-qPCR em tempo real, utilizando como controle endógeno os genes GAPDH e HPRT, como previamente descrito.

Para a padronização da técnica, primeiramente analisou-se a temperatura de anelamento para cada um dos *primers* com gradiente de temperatura por PCR convencional (55, 60, 65 e 70 °C), determinando-se que a condução dos ensaios subsequentes deveria ser realizada a 60 °C. Na próxima etapa, foram testadas diferentes concentrações dos *primers* senso (*forward*) e antisenso (*reverse*): 100/100 nM; 300/100 nM; 600/100 nM; 100/300 nM; 300/300 nM; 600/300 nM; 100/600 nM; 300/600 nM; 600/600 nM, sendo a combinação de 300/300 nM a escolhida para os ensaios subsequentes para todos os alvos. Sendo assim, foi realizada curva de diluição seriada para determinação dos valores de eficiência para os alvos GAPDH, HPRT e ANP (**Figura 19; A, B, C e D; Tabela 1**). A curva de *melting* dos produtos amplificados para cada alvo mostrou um pico único para todos os alvos (**Figura 19; E**) indicando a especificidade da reação e também a inexistência de dímeros. Para a última etapa de validação, a expressão dos alvos endógenos GAPDH e HPRT foi analisada através das amostras de tecido cardíaco (**Figura 19, F**), onde mostraram expressão constitutiva dos alvos selecionados, possibilitando a análise de expressão gênica pelo método de ddCt.

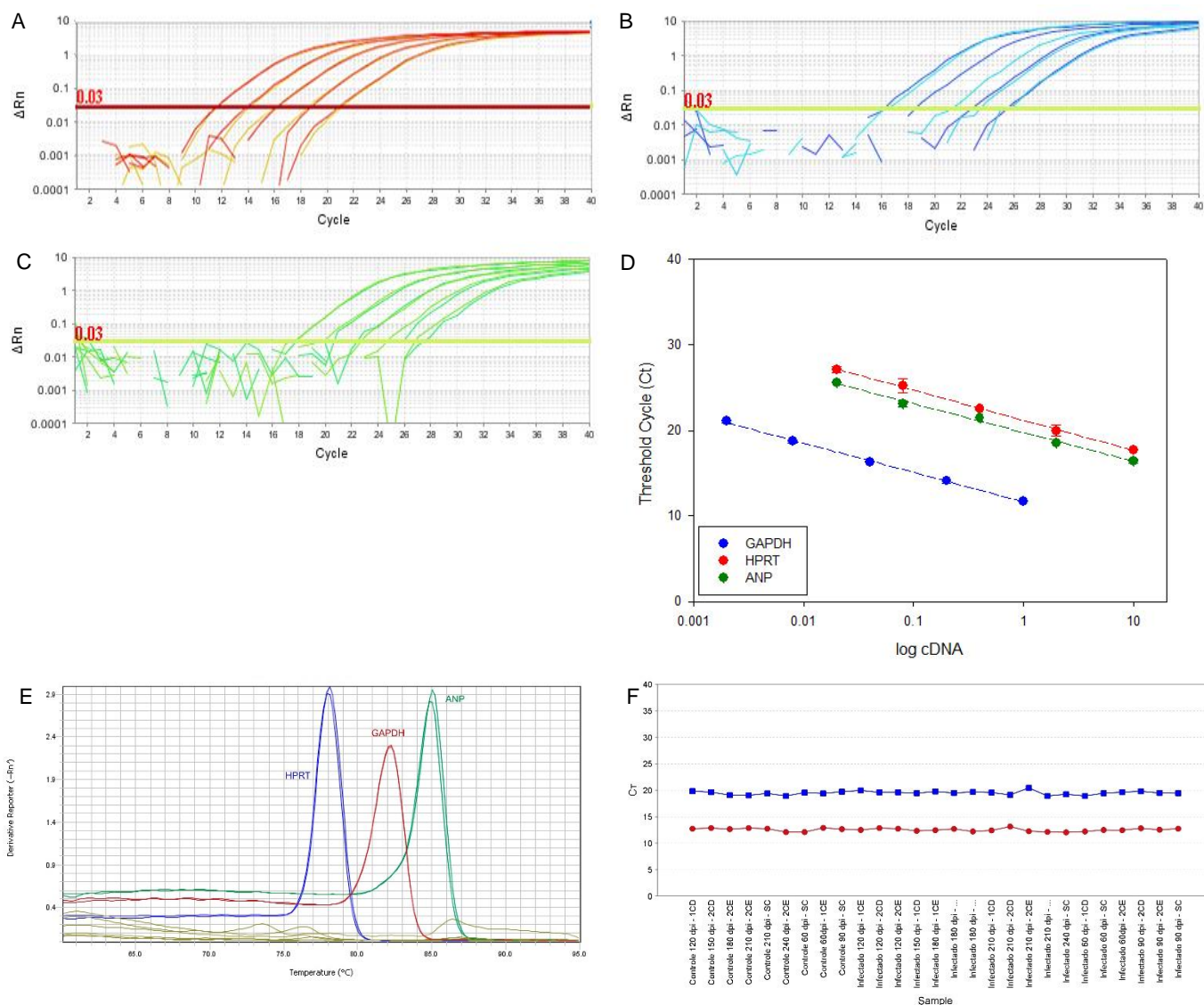


Figura 19. Padronização da RT-qPCR e validação da quantificação relativa pelo método de $\Delta\Delta C_t$. Gráfico de amplificação representativo com a magnitude do sinal fluorescente para o alvo (A) GAPDH, (B) HPRT e (C) ANP. (D) Curvas de diluição para obtenção dos valores de eficiência dos alvos GAPDH, HPRT e ANP (vide tabela 1) de tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 indicando a linearidade da reação. (E) Curva de *melting* para o alvo ANP indicando a especificidade da reação, observado através de um pico único em cada curva. (F) Expressão constitutiva dos alvos endógenos GAPDH (vermelho) e HPRT (azul) através das amostras de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* com score de 0.472 dado pelo Software Expression Suite v1.1 (Life Technologies).

Após a padronização, os genes foram quantificados por RT-qPCR e os resultados revelaram uma tendência ao aumento na expressão do RNAm de ANP nos camundongos com 120 dpi ($1,18 \pm 0,6$). Durante a cinética da infecção, os níveis dos transcritos de ANP apresentaram valores significativamente maiores, com o dobro de expressão gênica sendo observado após 150 dpi ($1,4$

$\pm 0,2$), em comparação ao grupo não infectado ($0,7 \pm 0,2$), e com pico de transcrição de RNAm notificado em 210 dpi ($1,4 \pm 0,3$) (**Figura 20**).

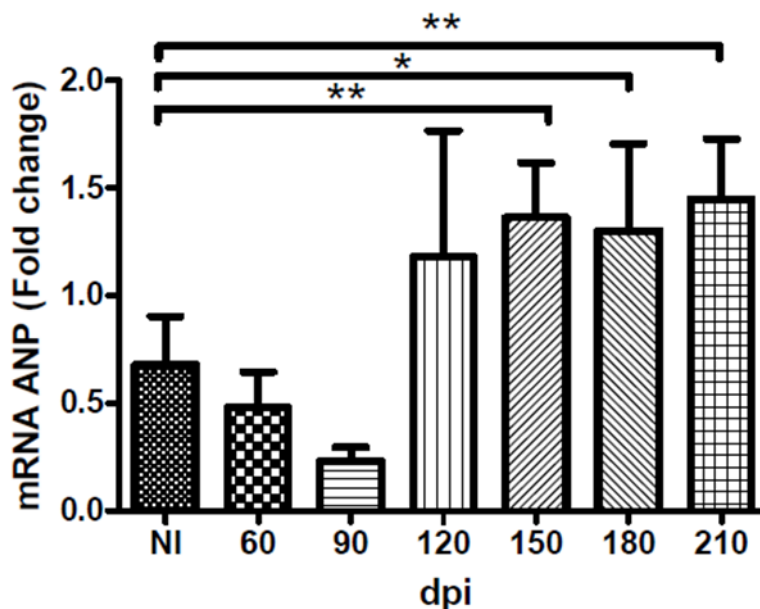


Figura 20: Expressão de gene envolvido na hipertrofia na infecção de C57BL/6 por *T. cruzi*. A quantificação dos genes por RT-qPCR demonstrou aumento de 2 vezes na expressão de ANP nos animais cronicamente infectados após 150 dpi. A normalização do gene foi realizada pelos endógenos GAPDH e HPRT. Os valores médios de Ct entre grupos controle e infectados foram avaliados pelo teste *t* Student ou teste não paramétrico de Mann-Whitney: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

5.4. Resposta fibrótica na cardiomiopatia chagásica

A elevada expressão de ET-1 e a ativação da via FAK-ERK1/2 em C57BL/6 cronicamente infectados por *T. cruzi* nos levaram a questionar a correlação da ativação desta via e a sobrecarga cardíaca. Assim, avaliamos a distribuição espacial e expressão de componentes de matriz extracelular (MEC) – como fibronectina (FN) e colágeno 1 (Col 1) – uma vez que a resposta fibrótica se mostra associada à hipertrofia miocárdica e insuficiência cardíaca na DC. Desta forma, a distribuição espacial das proteínas de MEC nos cortes congelados de tecido cardíaco em diferentes tempos de infecção (60 – 210 dpi) foi analisada por imunofluorescência indireta. Foi evidenciado um aumento substancial do sinal fluorescente para FN no miocárdio na fase aguda da

infecção experimental por *T. cruzi* (60 dpi; **Figura 21, B**), com espesso depósito dessa glicoproteína no interstício celular durante a infecção crônica (**Figura 21; C - G**). Animais controle, por sua vez, também apresentaram FN distribuída no espaço intersticial do tecido cardíaco, mas com baixa intensidade de fluorescência quando comparado ao miocárdio dos animais infectados (**Figura 21; A**). Os resultados de western blot corroboram o aumento acentuado na expressão dessa proteína nos corações de camundongos infectados por *T. cruzi* com 60 dpi ($1,2 \pm 0,3$), 90 dpi ($1,1 \pm 0,4$), 120 dpi ($1,1 \pm 0,4$), 150 dpi ($1 \pm 0,2$), 180 dpi ($1,35 \pm 0,2$) e 210 dpi ($1,96 \pm 0,6$) quando comparados ao grupo de animais controle ($0,2 \pm 0,1$) (**Figura 21; H**). Estes dados revelaram que a elevada produção de FN atingiu valores aproximadamente 10 vezes maiores no tempo mais tardio de infecção (210 dpi), sugerindo uma resposta de reparo tecidual em C57BL/6 cronicamente infectados por *T. cruzi*. Além disso, a produção de COL 1 em resposta à injúria miocárdica gerada pela infecção parasitária também foi analisada nas diferentes fases da infecção experimental. A imunodeteção fluorescente revelou aumento gradual de deposição fibrilar de COL 1 em animais na infecção aguda (60 dpi; **Figura 22, B**) e crônica inicial (90 dpi; **Figura 22, C**), e demonstrou acentuado espessamento das fibras colágenas após 120 dpi (**Figura 22; D - G**). A expressão aumentada de COL 1 foi confirmada por análise quantitativa do sinal fluorescente, utilizando o programa Knime. A análise da intensidade de fluorescência revelou aumento significativo na expressão desta proteína em C57BL/6 com 60 dpi (34 ± 5) e 90 dpi (37 ± 3), sendo ainda alcançados níveis de COL 1 aproximadamente 2 vezes superiores nos camundongos cronicamente infectados em 120 dpi (55 ± 13), 150 dpi (59 ± 23), 180 dpi (52 ± 17) e 210 dpi (53 ± 9), em comparação com os níveis proteicos basais observados nos animais controle (25 ± 7) (**Figura 22; H**). Destaca-se que as alterações na MEC, indutoras de sobrecarga cardíaca, são compatíveis com os distúrbios cardíacos evidenciados pelo ECG e fenótipo hipertrófico.

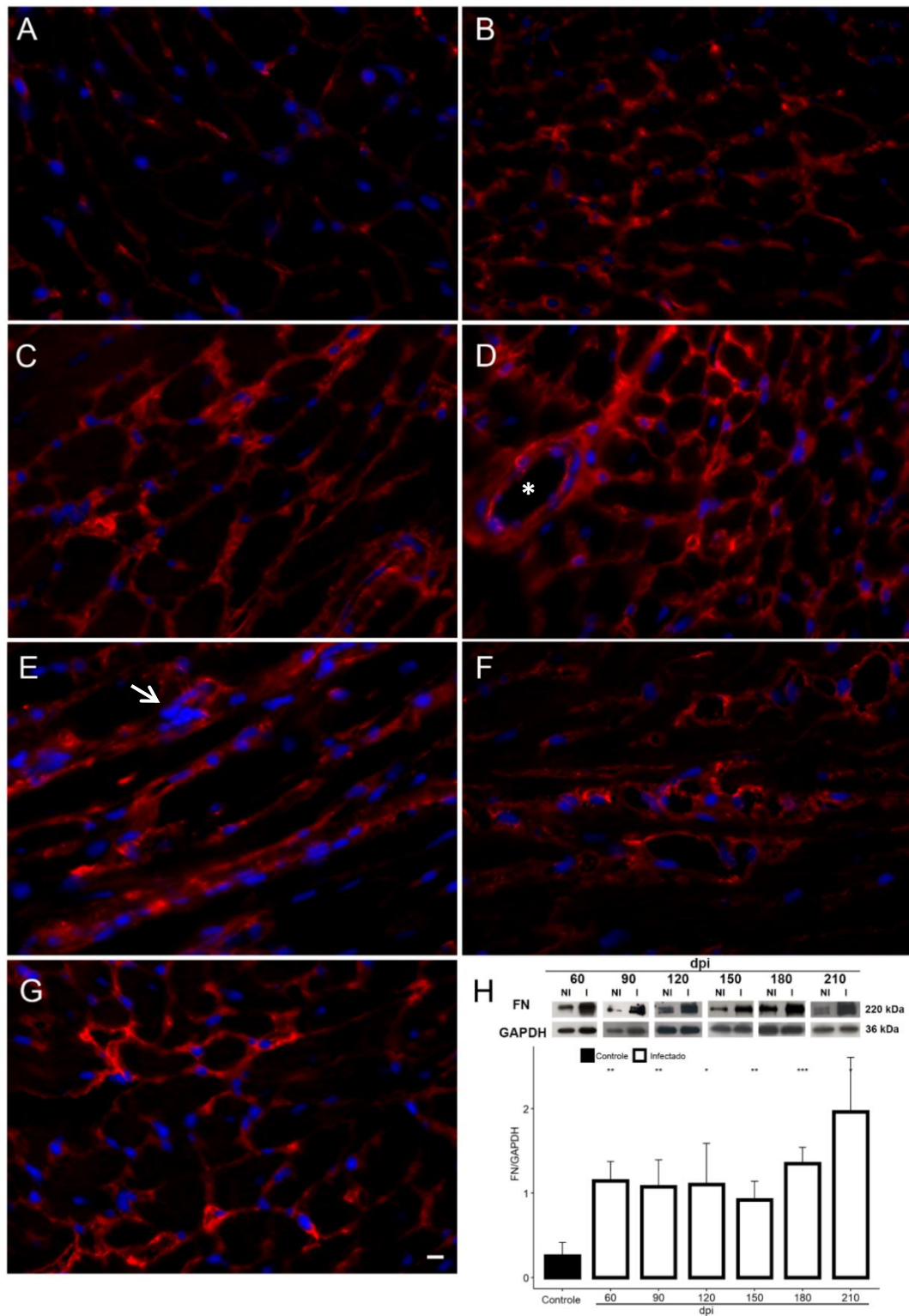


Figura 21: Distribuição espacial e expressão de fibronectina (FN) no miocárdio de camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi*, cepa Brasil. A análise de imunohistoquímica revelou uma fina camada de FN preenchendo o espaço intersticial cardíaco em animais não infectados (A). Espessa deposição de FN foi observada no miocárdio de animais infectados por *T. cruzi* em 60 (B), 90 (C), 120 (D), 150 (E), 180 (F) e 210 dpi (G). Superexpressão de FN foi observada em C57BL/6 cronicamente infectados quando comparados aos animais não infectados (H). DAPI (azul) – corante de DNA; fibronectina (vermelho). Asterisco (*): vaso sanguíneo; Seta: infiltrado inflamatório. Barra: 10 μ m. A média dos valores foi obtida por normalização com GAPDH. Teste t Student: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

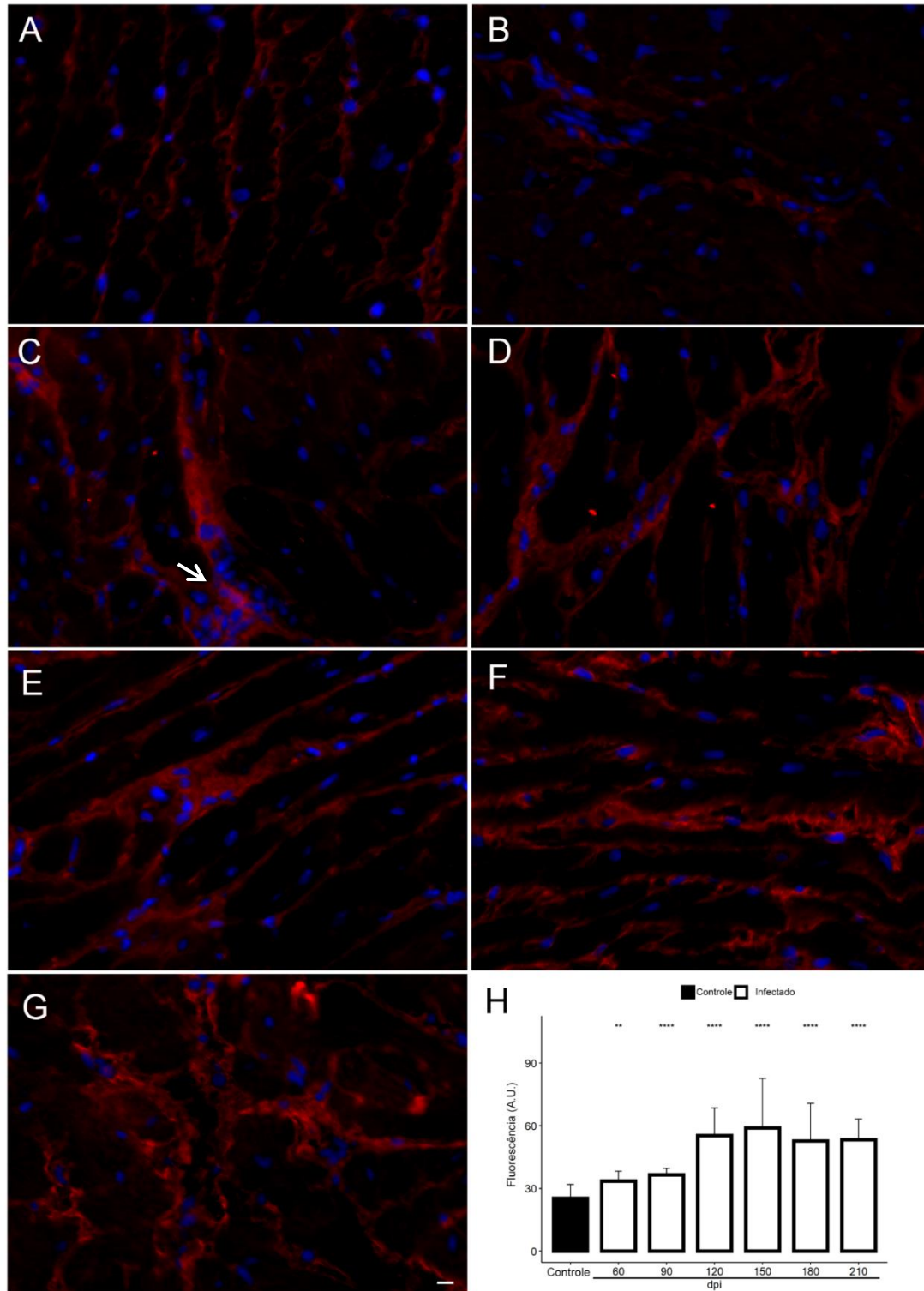


Figura 22: Detecção de colágeno 1 (COL 1) no tecido cardíaco de C57BL/6 nas fases aguda e crônica da infecção. Intensa marcação de COL 1 foi evidenciada no miocárdio de camundongos com 120 (D), 150 (E), 180 (F) e 210 dpi (G), compatível com a presença de fibras colágenas de grande espessura no espaço intercelular. Em contraste, camundongos controles apresentaram reduzida expressão dessa proteína no tecido cardíaco (A) e a deposição fibrilar ocorreu gradualmente durante a fase aguda (60 dpi; B) e o início do estágio crônico da infecção (90 dpi; C). Quantificação realizada pelo programa Knime demonstrou a abundante expressão do COL 1 miocárdico nas fases mais tardias da infecção com *T. cruzi* (H). DAPI (azul) – corante de DNA; COL 1 (vermelho). Setas : infiltrado inflamatório. Barra= 10 μ m. Teste t Student: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

DISCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO

A hipertrofia miocárdica, caracterizada como uma resposta dos miócitos cardíacos aos estímulos mecânicos e neuro-hormonais, é gerada por mecanismos biomoleculares dependentes da participação de receptores celulares e da ativação de importantes vias de sinalização que culminam com a transcrição dos genes que induzem hipertrofia. A re-expressão dos genes envolvidos com o desenvolvimento embrionário (ANP, cadeia pesada de β -miosina, α -actina esquelética) é um evento clássico da hipertrofia patológica, sendo estas proteínas consideradas biomarcadores hipertróficos (revisto por Carreño et al., 2006; revisto por Nakamura & Sadoshima, 2018). Contudo, cabe ressaltar que embora essas alterações celulares atuem como um fenômeno adaptativo inicial ao estresse biomecânico, a condição hipertrófica prolongada tende a comprometer o funcionamento do coração, compatível com a desorganização sarcomérica permanente e a disfunção contrátil do coração, e favorecer o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (revisto por Yan et al., 2019).

Sob a perspectiva molecular, múltiplas proteínas são descritas como sinalizadoras intracelulares pró-hipertróficas e a ativação dessas moléculas pode ocorrer em decorrência da força exercida sobre a membrana plasmática, responsável por ativar canais iônicos, integrinas e PTKs (Matsuda et al., 1996; revisto por Carreño et al., 2006; Ross & Borg, 2001; Sadoshima et al., 1996), e em resposta aos fatores humorais (fator de crescimento de fibroblastos (FGF), IGF e TGF- β) que atuam sobre os receptores de membrana com atividade tirosina quinase e disparam mensageiros secundários conduzindo à resposta de crescimento celular (Lupu et al., 2001; Oudit et al., 2004). Além desses, cabe ressaltar a participação de GPCRs que podem ser ativados por ET-1, Ang II e catecolaminas (revisto por Samak et al., 2016), demonstrando a participação de diferentes vias de sinalização durante a resposta hipertrófica cardíaca.

Na cardiomiopatia chagásica, elevados níveis de expressão de ET-1 são reportados na fase aguda da infecção murina em decorrência da invasão inicial do *T. cruzi* no sistema cardiovascular (Corral et al., 2013; Petkova et al., 2000). A persistência do parasito na fase crônica modula a atividade de ET-1, podendo acarretar lesão vascular, remodelamento cardíaco (fibrose e hipertrofia) e

aumento dos níveis de agentes inflamatórios que, por sua vez, regulam positivamente a produção de ET-1. Ainda, coincidindo com esses achados, estudos em humanos demonstraram a presença de níveis elevados de ET-1 no plasma de pacientes portadores de DC crônica (Salomone et al., 2001). Assim, nossos dados de elevados níveis plasmáticos de ET-1 na infecção de C57BL/6 por *T. cruzi* cepa Brasil são consistentes com os previamente reportados (Petkova et al., 2001), com aumento de ET-1 evidenciado no estágio tardio da infecção aguda (60 dpi) e durante o curso da infecção crônica (90 a 210 dpi) associado à fibrose do miocárdio e insuficiência cardíaca, reforçando o fato de que ET-1 seja capaz de ativar vias de sinalização indutoras de respostas pró-fibrótica e hipertrófica.

Estudos adicionais demonstraram que camundongos CD1 infectados com cepa Brasil e C57BL/6 infectados com Tulahuen de *T. cruzi*, apresentam altos níveis plasmáticos de ET-1 na fase aguda de infecção (10 a 15 dpi), bem como miocardite e vasculite intensa (Petkova et al., 2000). Foi evidenciado ainda, que camundongos C57BL/6 deficientes em ET-1, onde o gene de ET-1 foi deletado em miócitos cardíacos, apresentaram melhor prognóstico durante o curso da infecção com *T. cruzi* cepa Brasil. Contudo, os animais controle (*wild-type*) e deficientes em ET-1 de células endoteliais evoluíram para uma cardiomiopatia grave, com aumento significativo no diâmetro interno do ventrículo direito (DIVD) e intensa fibrose do miocárdio (Tanowitz et al., 2005), o que demonstra que ET-1 sintetizada por cardiomiócitos atua como molécula protagonista na vasculopatia observada na cardiomiopatia chagásica. Além disso, dando suporte ao papel de ET-1 na indução hipertrófica, a incubação de células endoteliais com o fármaco fosforamidona, inibidor da enzima conversora de endotelina, revelou menor secreção de ET-1 no sobrenadante destas células e redução na gravidade do dano cardíaco induzido por *T. cruzi* (Petkova et al., 2001).

Considerando a atuação de ET-1 na patogenia cardíaca, é importante destacar que a alta produção desse peptídeo, evidenciada neste estudo, foi acompanhada pela ativação da via de ERK1/2. Uma regulação positiva de ERK1/2 fosforilada na fase aguda (60 dpi) e crônica (90 – 210 dpi) de infecção por *T. cruzi* está associada ao aumento de fibrilas de COL1 e FN no miocárdio, bem como a contínua expressão de ET-1 nesses animais. Como reportado, membros da família MAPK, incluindo ERK1/2, estão envolvidos na regulação de

fibrose e podem ser modulados por ET-1 (Rodríguez-Pascual et al., 2014). Este evento pode ser regulado por diferentes mecanismos como a indução de vasoespasmo por ET-1 resultando em isquemia miocárdica focal e, conseqüentemente mionecrose, acarretando fibrose e hipertrofia (Tanowitz et al., 2005); o efeito sinérgico de ET-1 e TGF- β modulado por ERK1/2/MAPK, como proposto na patogênese da hipertensão arterial pulmonar (Lambers et al., 2013); a estimulação de miofibroblastos decorrente de injúria do miocárdio e sobrecarga cardíaca ou mesmo por moléculas sinalizadoras como ET-1, FGF e TGF- β (Liu et al., 2017), entre outros.

Um mecanismo chave da insuficiência cardíaca é a remodelação do coração decorrente da lesão tecidual e fibrose miocárdica (Heusch et al., 2014). A resposta inflamatória do hospedeiro contra *T. cruzi* gera dano tecidual seguido de deposição de colágeno fibrilar como mecanismo de reparo tecidual. O aumento nos níveis de ET-1 tem sido correlacionado com a disfunção cardíaca (Petkova et al., 2001; Tanowitz et al., 2005). No entanto, além de ET-1 apresentar efeito pró-fibrótico, diversas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-5, TGF- β , entre outras) podem participar do processo de gênese e regulação da fibrose, ampliando assim os danos no coração. Estudos reportam que ET-1 é capaz de modular positivamente a expressão de TGF- β , ativar miofibroblastos e exacerbar a produção de MEC (Wermuth et al., 2016). A fibrose acarreta rigidez mecânica e alteração diastólica e, progressivamente, disfunção sistólica e hipertrofia (revisto por Chaves et al., 2019; revisto por Freeman, et al., 2014). Na infecção por *T. cruzi*, a disfunção do nó sinusal, arritmias ventriculares, BAV, ondas Q anormais, segmento ST, ondas T e ainda, disfunção autonômica constituem as anormalidades eletrocardiográficas mais frequentes (Salles et al. 2003; Garcia et al. 2005). Nossos achados eletrocardiográficos também revelaram anomalias no sistema de condução elétrica do coração, principalmente na fase crônica de infecção. Os camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* cepa Brasil apresentaram importantes arritmias cardíacas, com BRA e BAV sendo os eventos mais frequentes no estágio tardio da infecção crônica (150 – 180 dpi). Estes parâmetros eletrocardiográficos estão diretamente relacionados com baixa frequência cardíaca e prolongamento do intervalo PR evidenciados em nosso estudo e característicos de insuficiência cardíaca. No entanto, na infecção experimental por *T. cruzi*, o grau do comprometimento cardíaco parece evoluir

de forma distinta a depender da linhagem do camundongo e cepa de *T. cruzi*. Alterações eletrocardiográficas e fenótipo hipertrófico são evidentes em C57BL/6 infectados com *T. cruzi* cepa colombiana entre 30 a 90 dpi enquanto a cepa Brasil apresenta uma evolução gradativa destes fenótipos (> 100 dpi). Acentuado aumento de BRA e prolongamento dos intervalos PR e QTc durante o curso da infecção, assim como, alterações na condução do impulso elétrico acompanhados de arritmias e BAV, foram evidenciados em camundongos C57BL/6 infectados com colombiana em 90 dpi (Silvério et al., 2012). Ainda, aumento da massa do ventrículo esquerdo e diâmetro do ventrículo direito foram observados por ecocardiograma a partir de 30 dpi com a cepa colombiana (Roman-Campos et al., 2013). Por outro lado, ausência de alterações no ECG foi reportado em camundongos C57BL/6 infectados com cepa Brasil em períodos curtos de infecção (13 semanas) (Eickhoff et al., 2010) enquanto alterações ecocardiográficas, características de hipertrofia dilatada, foram relatadas mais tardiamente neste modelo experimental (>100 dpi; Tanowitz et al., 2005), revelando uma lenta evolução da cardiomiopatia crônica. Estes dados corroboram nossos achados de insuficiência cardíaca na infecção crônica tardia, sem alterações eletrocardiográficas relevantes na infecção aguda (60 dpi).

As anomalias eletrocardiográficas evidenciadas na fase aguda de infecção parecem retratar os distúrbios na mecanotransdução previamente descritos na infecção de cardiomiócitos in vitro e in vivo, comprometendo a fisiologia cardíaca durante o curso da infecção (Melo et al., 2004, 2019). A desorganização da distribuição costamérica de vinculina e alinhamento irregular dos discos intercalares foram observados em áreas do miocárdio contendo ninhos de amastigotas e infiltrado inflamatório, contribuindo com a desconexão entre MEC – integrina – citoesqueleto nos cardiomiócitos e, conseqüentemente, com a redução da força de contração durante a transmissão elétrica no coração (Melo et al., 2004; revisto por Chaves et al., 2019). Além disso, a expressão reduzida das proteínas mecanossensitivas (talina e paxilina) e mudanças na sua distribuição espacial também foram evidenciadas durante a progressão do ciclo intracelular de *T. cruzi* (72 hpi) nos miócitos cardíacos, juntamente com a depleção na fosforilação de FAK (Melo et al., 2019). No entanto, na fase crônica, onde ninhos de amastigotas são raros, a progressão da fibrose compromete a contração muscular e agrava progressivamente as arritmias cardíacas.

Neste cenário de sobrecarga cardíaca, a ET-1 liberada ativa proteínas com atividade tirosina quinase e modula a resposta hipertrófica na cardiomiopatia patológica (Kovacic-Milivojevic et al., 2001). O conhecimento de que a endotelina ativa Src e modula a fosforilação de p130Cas e FAK em miócitos cardíacos consolidam a participação desse neuro-hormônio, em cooperação com proteínas de adesão focal, estimulando a atividade promotora dos genes para ANP (Kovacic-Milivojevic et al., 2001). Estudos com miócitos ventriculares de camundongos neonatos (NRVMs) demonstraram que o estímulo crônico com ET-1 induz a sinalização de FAK e paxilina e aumento na biossíntese de proteínas miofibrilares e na reorganização sarcomérica (Eble et al., 2000). Adicionalmente, ensaios com inibidores farmacológicos da via RhoA/ROCK em NRVMs revelaram que essa via é crítica para a ativação de FAK, em condições de estresse mecânico, e que a atuação conjunta dessas vias regula a expressão da cadeia pesada de β -miosina e, conseqüentemente, atuam sobre o programa genético hipertrófico (Torsoni et al., 2005). Ainda, tem sido mostrado que a interação FAK-integrina β 3 é elevada em corações hipertróficos submetidos ao aumento de pressão e que MEC podem ativar FAK em um mecanismo de crescimento de cardiomiócitos induzido por fenilefrina e dependente da fosforilação de ERK1/2 (Kuppuswamy et al., 1997; revisto por Franchini, 2012; revisto por Murphy et al., 2020). Pesquisas complementares utilizando camundongos transgênicos com superexpressão de FAK cardíaca revelaram presença de hipertrofia concêntrica nos miócitos cardíacos e ainda, que o tratamento com rapamicina reverte a hipertrofia nesses animais, sugerindo que a via PI3K/AKT/mTOR estaria disparada durante o estresse crônico (Clemente et al., 2012). Além disso, o silenciamento do RNAm de FAK miocárdica previne e reverte a hipertrofia do ventrículo esquerdo, apesar da persistência da sobrecarga cardíaca, aumentando a sobrevida dos camundongos após o tratamento com o RNA de interferência (Clemente et al., 2007). Em complementação, a inibição farmacológica dessa PTK também foi descrita como atenuante da diferenciação de miofibroblastos e da fibrose cardíaca, além de preservar parcialmente a função do ventrículo esquerdo (Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2016). Portanto, partindo do pressuposto que FAK é uma importante molécula mediadora da hipertrofia e fibrose, múltiplas

cascatas de sinalização foram descritas mediando a atuação dessa PTK nas células musculares cardíacas (revisto por Franchini 2009).

A atuação do complexo FAK/c-Src como mensageiro intracelular conta com a indução de importantes cascatas de sinalização, dentre as quais estão incluídas as vias AKT/mTOR, JNK/c-Jun e ERK1/2 regulando a expressão de RNAm de genes hipertróficos (Nadruz et al., 2005; revisto por Franchini, 2012). A amplitude de cascatas sinalizadoras e o reconhecimento de que a fosforilação de ERK1/2 está diretamente relacionada com a via de FAK no disparo da resposta compensatória cardíaca idiopática (revisto por Franchini, 2012), levantou à hipótese de que as vias de FAK e ERK1/2 poderiam atuar sinergicamente durante a resposta hipertrófica induzida por *T. cruzi*. Desse modo, a elevada expressão de FAK fosforilada nos resíduos Y397 e S910 durante o curso crônico da infecção, mais precisamente a partir de 90 e 120 dpi, respectivamente, demonstrada nesse estudo, sugere dois possíveis mecanismos de ativação de FAK durante a hipertrofia cardíaca: um mediado por estresse biomecânico em um mecanismo de ligação de FAK com integrinas, acarretando autofosforilação do seu resíduo Y397, e outro, desencadeado pela interação de ET-1 com os GPCRs que culmina na ativação específica do resíduo S910 da molécula de FAK, conforme previamente descrito (Chu et al., 2011; revisto por Samarel, 2014). Esses achados sugerem que a ativação da via FAK – ERK1/2 modula a transcrição dos genes hipertróficos na cardiomiopatia chagásica.

Neste estudo, houve um aumento significativo na expressão do RNAm de ANP, que foi evidenciado a partir de 150 dpi, embora o número de transcritos apresente tendência ao aumento desde 120 dpi. Este resultado coincide com os níveis mais elevados de fosforilação de FAK-Y397 (120 dpi) e de FAK-S910 (120 e 180 dpi), sugerindo que essa PTK atue ativamente na manutenção da hipertrofia cardíaca durante a fase crônica da infecção parasitária. Notavelmente, os índices elevados de ET-1 plasmática foram observados durante todo curso da infecção estudado, sobretudo, entre 90 a 150 dpi, e seu decréscimo foi iniciado mais tardiamente, contrastando com a intensa produção de transcritos de ANP nesse mesmo período. Estes resultados estão de acordo com a via de regulação de ET-1, onde o aumento nos níveis deste peptídeo, sintetizado por miócitos e fibroblastos cardíacos, aumenta a proliferação de

fibroblastos e a síntese de ANP em miócitos ventriculares (revisto por Kerkelä et al., 2015), enquanto a elevada produção e secreção de ANP modula negativamente a expressão do gene de ET-1 nos fibroblastos pela inibição da via de ERK (Glenn et al., 2009).

Mediante a multiplicidade de vias indutoras da resposta cardiopatológica, nossa hipótese (**Figuras 23**) é que o aumento dos níveis plasmáticos de ET-1, proporcionando um microambiente de focos inflamatórios e dano tissular, induziria a ativação da via de sinalização de ERK1/2 resultando no aumento da produção de MEC (COL1 e FN) por miofibroblastos. A sobrecarga cardíaca, decorrente de fibrose a partir de 60 dpi, dispara, via integrina, a cascata de sinalização de FAK, evidenciada a partir de 90 dpi pela autofosforilação de seu resíduo Y397. Em paralelo, a persistência de níveis elevados de ET-1 e ERK1/2 fosforilada induzem a fosforilação do resíduo S910, sendo observado que o pico de ativação de ERK1/2 coincide com a elevada expressão de fosforilação de S910 e o perfil hipertrófico evidenciado pelo aumento da transcrição do gene de ANP (**Figura 24**).

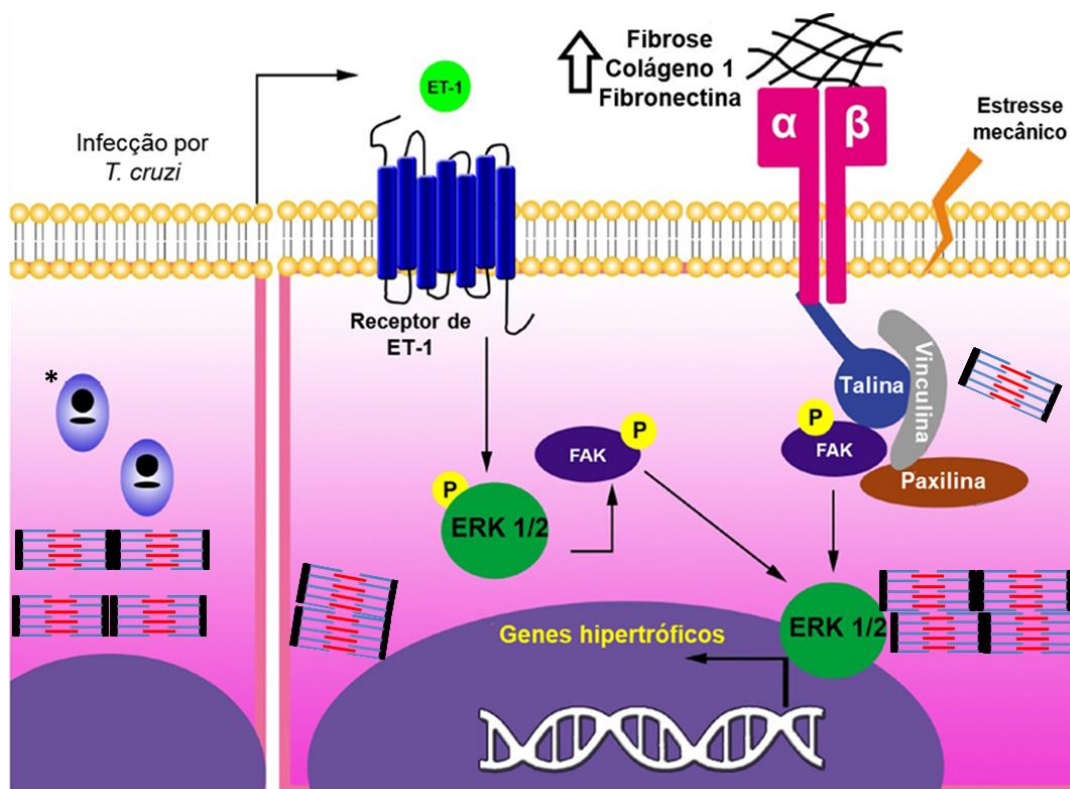


Figura 23. Esquema representativo da sinalização de FAK na hipertrofia chagásica. A ativação bidirecional de FAK mediada por ET-1 e integrinas pode ativar as vias interligadas FAK – ERK1/2 e induzir a transcrição de RNAm de ANP, conduzindo ao fenótipo de hipertrofia cardíaca. Formas amastigotas (*) são representativas de um tecido cardíaco infectado com *T. cruzi* (à esquerda). (Adaptado de Tucci et al., 2020).

Estes processos modulados por estresse mecânico e agentes humorais implicam na manutenção da elevada expressão de ERK1/2 responsável pela transcrição de genes hipertróficos (**Figura 24**).

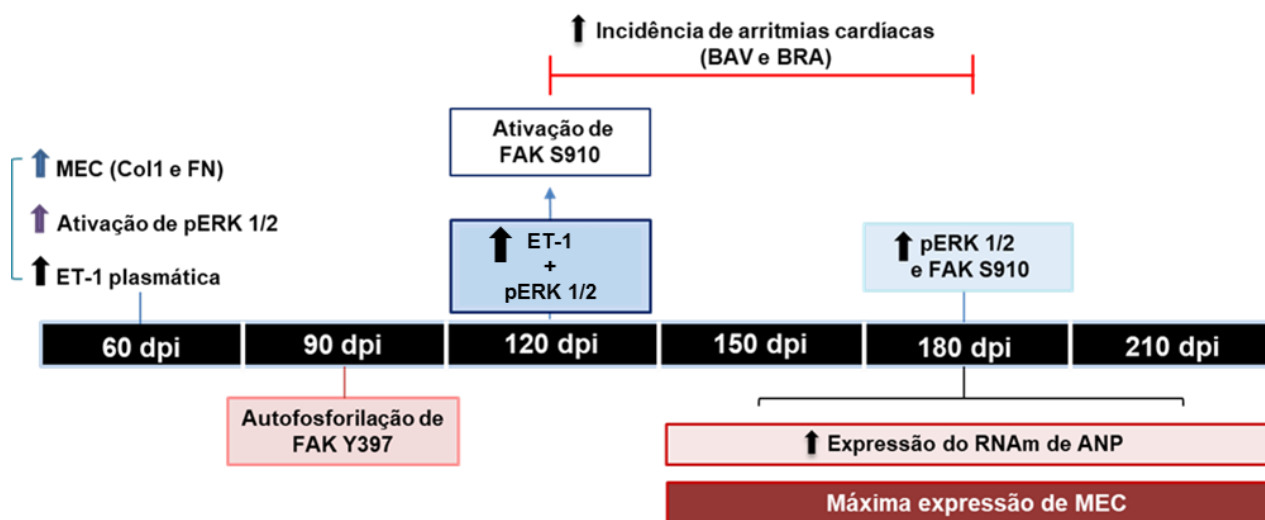


Figura 24: Representação temporal dos eventos observados no modelo murino cronicamente infectado com *T. cruzi* desde a fase aguda (60 dpi) até os estágios tardios da infecção experimental (90- 210 dpi) e o cenário multifatorial responsável pelo fenótipo hipertrófico cardíaco evidenciado neste estudo.

No entanto, a ativação de FAK pode desencadear uma cascata de sinalização envolvendo diferentes vias de sinalização associadas ao perfil hipertrófico. A autoativação de FAK, por exemplo, recruta proteínas da família c-Src e ativa proteínas Grb2 e a via subjacente PI3K/AKT/ERK1/2 (Brancaccio et al., 2006; Franchini, 2012; Franchini et al., 2000). Além disso, a fosforilação de S910 pode desestabilizar a interação FAK-paxilina e facilitar a interação do seu resíduo Y925 com a proteína Grb2 durante o crescimento hipertrófico (revisto por Mohanty, & Bhatnagar, 2018). Além destas vias, os mecanismos de crescimento hipertrófico regulados por FAK também podem disparar a fosforilação de membros da família MAPK, como JNK e a proteína quinase p38 ativada por mitógeno (Parsons, 2003) e ainda coordenar a sinalização de NF- κ B nos cardiomiócitos em resposta às desordens mecânicas (Crosara-Alberto, et al., 2009). FAK também modula positivamente a via de AKT e mTOR e essa ação conjunta medeia a resistência de miócitos cardíacos após estresse mecânico e promove a sobrevivência, a redução da proteólise e impede a autofagia nestas células (revisto por Franchini, 2012; Oudit & Penninger, 2009).

Um estudo detalhado do disparo da via de sinalização de FAK por ET-1 na hipertrofia de NRVMs demonstrou que esta ativação é mediada por proteína quinase C delta (PKC δ), resultando na ativação de ERK (Eble et al., 2000; Franchini et al., 2012). A atuação dessa via conduz a fosforilação de FAK S910 a partir da cascata Raf-1–MEK1/2–ERK1/2 e, paralelamente, pela fosforilação de proteínas MEK5–ERK5. Contudo, também foi evidenciado que as proteínas c-Src podem regular simultaneamente as vias ERK1/2 e ERK5 fosforilando o resíduo S910 durante o evento hipertrófico (Chu et al., 2011). Portanto, a ativação de FAK-S910 pode ser mediada concomitantemente e pelas vias bidirecionais de PKC δ e c-Src mediante estímulo por ET-1 (Chu et al., 2010; Chu et al., 2011). Assim, os dados de ativação de FAK-S910 na cardiomiopatia hipertrófica idiopática reforçam nossa hipótese sobre o envolvimento da rota ET-1/ ERK1/2 estimulando a fosforilação de FAK-S910 e transcrição dos genes responsivos à hipertrofia na infecção por *T. cruzi*.

Dentre as vias de sinalização ativadas por FAK, algumas já foram descritas no disparo de hipertrofia modulada por *T. cruzi*.

Neste contexto, evidências reportaram que a ação conjunta da infecção por *T. cruzi* e o estímulo com ET-1 em miócitos atriais HL-1 levaram a produção de COX-2 e de ANP mediante via Ca²⁺/calcineurina/ NFAT na cardiomiopatia chagásica (Corral et al., 2013). Coincidentemente, estudos sobre a etiologia da hipertrofia cardíaca idiopática revelaram que a ativação da via calcineurina/ NFAT e MAPK (ERK e JNK) eram codependentes e coordenavam a resposta patológica hipertrófica, a fibrose e também a expressão de ANP e BNP (Cui et al., 2018; revisto por Molkenin, 2004; Sanna et al., 2005). Ainda, estudos retratam que a infecção aguda por *T. cruzi* em cardiomiócitos primários humanos acarreta aumento na biogênese mitocondrial e na síntese de proteínas da respiração celular, via sinalização de AKT/mTORC1, que culmina com o aumento da respiração oxidativa e produção de ROS e, mais tardiamente, em danos nos cardiomiócitos que contribuem para o desenvolvimento do fenótipo patológico, como observado nas cardiomiopatias hipertrófica e dilatada (Libisch et al., 2018). Além disso, a ligação estabelecida entre o heterodímero TLR2/6 da membrana dos cardiomiócitos e as moléculas presentes na superfície dos tripomastigotas, ou secretadas por este parasito, ativam NF- κ B que induz a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β coordenando o crescimento

hipertrófico dos miócitos cardíacos (Petersen et al., 2005). Ainda, a elevada síntese de TGF- β durante a infecção aguda e crônica por *T. cruzi*, também evidenciada no modelo murino, é responsável pela ativação constante da via AKT/PI3K/NO, a qual estimula a produção permanente e crescente de NO durante todo o curso da doença, podendo influenciar no aumento da liberação de Ca²⁺ sarcoplasmático e no prolongamento do potencial de ação que são compatíveis com os distúrbios eletrofisiológicos analisados na fase crônica da infecção (Roman-Campos et al., 2013). Interessantemente, cardiomiócitos humanos derivados de pacientes cronicamente infectados também apresentaram elevado efluxo de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático, em consequência da elevada expressão de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) sob presença de ET-1 ou bradicinina, o que indica que o aumento crônico desse íon gera efeito deletério nas células cardíacas e acarreta disfunções miocárdicas graves na DC (Mijares et al., 2020). Em paralelo, a desregulação de Ca²⁺ também é evidenciada em camundongos com superexpressão cardíaca dos receptores IP3 tipo 2, em resposta ao estímulo por ET-1, e indica que o aumento citoplasmático de Ca²⁺ pode conduzir ao fenótipo hipertrófico mediante ativação da via calcineurina/NFAT também na cardiomiopatia idiopática (Nakayama et al., 2010). Estudos adicionais reforçam essa temática ao demonstrar que a inibição de osteopontina (OPN), uma citocina pleiotrópica envolvida na ativação da resposta imune Th1 e Th17, é capaz de reduzir a diferenciação de miofibroblastos, produção de COL1 e a miofibrose na cardiomiopatia dilatada idiopática por um mecanismo depende de FAK (Zhao et al., 2016). Este achado é altamente relevante, uma vez que OPN também é sintetizada na infecção crônica por *T. cruzi* (cepa Brasil) e contribui com o estabelecimento de intensa resposta inflamatória e fenótipos hipertrófico e fibrótico no modelo murino (Caballero et al., 2018). Nesta vertente, é reconhecido que diferentes vias de sinalização ativadas na cardiopatologia idiopática, mediadas por FAK, também podem participar dos eventos de cardiomiopatia induzida por *T. cruzi* (Castillo et al., 2013; Crosara-Alberto, et al., 2009; Huang et al., 2003; Parsons, 2003).

Em conjunto, esse estudo contribui com novos conhecimentos sobre as interações biomoleculares envolvidas na hipertrofia cardíaca induzida por *T. cruzi* sendo, especificamente, demonstrado que a via de sinalização de FAK, desencadeada por estresse biomecânico – induzido por aumento de MEC e

sobrecarga cardíaca – ou por ET-1, pode disparar diferentes cascatas sinalizadoras que coordenam a ativação dos genes associados à hipertrofia (ANP). Esses dados ampliam o entendimento acerca da sinalização celular envolvida na cardiomiopatia chagásica e abrem novas perspectivas quanto a aplicação de inibidores da via de sinalização de FAK na terapia da doença de Chagas.

CONCLUSÃO

VII. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir:

1. A infecção de camundongos C57BL/6 por *T. cruzi* cepa Brasil induz alterações eletrocardiográficas características de insuficiência cardíaca, sobretudo na fase crônica da doença de Chagas (> 120 dpi), sendo o comprometimento na condução atrioventricular e a redução na frequência cardíaca os principais distúrbios cardíacos evidenciados neste estudo.

2. Elevados níveis plasmáticos de ET-1 nos camundongos cronicamente infectados parecem modular a ativação ERK1/2 – FAK-S910 enquanto a ativação da via FAK-Y397 – ERK1/2 pode ser regulada por integrinas devido à sobrecarga hemodinâmica decorrente da fibrose cardíaca.

3. O disparo da via de FAK ativa o programa dos genes fetais que codificam para ANP e sugere a indução dos processos de sarcomerogênese e miofibrilogênese em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*.

4. A fibrose do miocárdio, evidenciada por um aumento na expressão de FN e COL 1 no final da fase aguda (60 dpi) até infecção tardia (\geq 90 dpi), indica uma resposta de reparo tecidual progressiva nesta fase da infecção que é compatível com a insuficiência cardíaca grave reportada na doença cardíaca chagásica.

Conclusão geral:

O dano tecidual miocárdico gerado pela infecção por *T. cruzi* induz aumento na produção de ET-1, resposta de remodelamento cardíaco e significativas anormalidades eletrocardiográficas em camundongos cronicamente infectados. Esse cenário desencadeia uma resposta cardíaca adaptativa com ativação das vias ET-1 – ERK1/2 – FAK-S910 e integrina– FAK-Y397 – ERK1/2, a qual induz a transcrição dos genes responsivos à hipertrofia cardíaca. Assim, nossos resultados indicam que a via de sinalização de FAK regula a hipertrofia cardíaca evidenciada na cardiomiopatia chagásica.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. Anderson M and Granum S (eds). 5th edition. Garland Science, New York. 2007; 175.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hun T. Biologia Molecular da Célula. 6ª ed. Artmed, Porto Alegre. 2017; 1080.
- Albuquerque JB, Santos DS, Stein JV, Meis J. Oral Versus Intragastric Inoculation: Similar Pathways of *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection? From Target Tissues, Parasite Evasion, and Immune Response. *Front Immunol*. 2018; 9: 1734.
- Alevi KC, de Oliveira J, de Azeredo-Oliveira MT, da Rosa JÁ. Triatoma vitticeps subcomplex (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): a new grouping of Chagas disease vectors from South America. *Parasit Vectors*. 2017; 13;10(1):180.
- Alpern JD, Lopez-Velez R, Stauffer WM. (2017) Access to benznidazole for Chagas disease in the United States—Cautious optimism? *PLoS Negl Trop Dis* 11(9): e0005794.
- Altchek J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse Events After the Use of Benznidazole in Infants and Children With Chagas Disease. *Pediatrics*. 2011; 127 (1). e212-e218.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*. 1997; 57:328–336.
- Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata Filho AA, Moreira Mda C, Xavier SS, Oliveira Junior WA, Dias JC. I Latin American Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas' Heart Disease. Executive Summary *Arq Bras Cardiol*. 2010; 96(6):434-42.
- Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur J Intern Med*. 2017; 43:6-15.
- Arai H, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990; 348(6303):730–2.

- Araújo RF, José Mendonça V, Rosa JA, Matos JF, Lima SC, de Araújo Figueiredo MA. Description of a newly discovered *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Foci in Ibipeba, State of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(4):513-6.
- Archer CR, Robinson EL, Drawnel FM, Roderick HL. Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors. *Cell Signal*. 2017; 36: 240–254.
- Atherton P, Stutchbury B, Wang DY, Jethwa D, Tsang R, Meiler-Rodriguez E, Wang P, Bate N, Zent R, Barsukov IL, Goult BT, Critchley DR, Ballestrem C. Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat Commun*. 2015; 4(6):10038.
- Barbosa-Ferreira JM, Nobre AF, Maldonado JG, Borges-Pereira J, Zauza PL, Coura JR. Stroke in a chronic autochthonous chagasic patient from the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43:751–3.
- Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santanav-an-Vliet E de, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, et al. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLOS Negl Trop*. 19;9(6):e0003849.
- Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2008; 40, 2023–2039.
- Bartsch SM, Avelis CM, Asti L, Hertenstein DL, Ndeffo-Mbah M, Galvani A, Lee BY. The economic value of identifying and treating Chagas disease patients earlier and the impact on *Trypanosoma cruzi* transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(11), e0006809.
- Bello Corassa, R., Aceijas, C., Alves, P. A. B., & Garelick, H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. *Perspectives in Public Health*. 2016; 137(5), 289–295.
- Bennett C, Straily A, Haselow D, Weinstein S, Taffner R, Yaglom H, Komatsu K, Venkat H, Brown C, Byers P, Dunn J, Moncayo A, Mayes BC, Montgomery SP. Chagas Disease Surveillance Activities — Seven States, 2017. *Weekly*. 2018; 67(26);738–741.
- Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2011; 364(26), 2527–2534.

- Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289:H8–H16.
- Bocchi EA. Heart failure in South America. *Curr Cardiol Rev*. 2013; 9(2):147-56. Review.
- Bonney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*. 2014; 21: 11. Review.
- Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. Mechanisms of Disease Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2019. 14:421–47. Review.
- Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007; 5(1):45–52.
- Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: The tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc. Res*. 2006; 70 (3): 422–433.
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med trop*. 1962; 4:389-96.
- Brito BOF, Ribeiro ALP. Electrocardiogram in Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018; 51(5):570-577.
- Bueno OF, Molkenin JD. Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 in Cardiac Hypertrophy and Cell Death. *Circ. Res*. 2002; 91 (9): 776-781.
- Bupha-Intr T, Haizlip K M, Janssen PML. Role of Endothelin in the Induction of Cardiac Hypertrophy In Vitro. *PLoS ONE*. 2012;7(8), e43179.
- Caballero EP, Santamaría MH, Corral RS. Endogenous osteopontin induces myocardial CCL5 and MMP-2 activation that contributes to inflammation and cardiac remodeling in a mouse model of chronic Chagas heart disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018; 1864(1):11-23.
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*. 1995; 15:954–63.
- Cardoso AC, Pereira AHM, Ambrosio ALB, Consonni SR, Rocha de Oliveira R, Bajgelman MC, Dias SMG, Franchini KG. FAK Forms a Complex with MEF2 to

- Couple Biomechanical Signaling to Transcription in Cardiomyocytes. *Structure*. 2016; 24(8):1301–1310.
- Carrasco Guerra HA, Palacios-Prü E, Dagert de Scorza C, Molina C, Inglessis G, Mendoza RV. Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. *Am Heart J*. 1987; 113:716–724.
- Carreño JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE. Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Rev Esp Cardiol*, 2006; 59(5): 473–86.
- Castillo C, Villarroel A, Duaso J, Galanti N, Cabrera G, Maya JD, Kemmerling U. Phospholipase C gamma and ERK1/2 mitogen activated kinase pathways are differentially modulated by *Trypanosoma cruzi* during tissue invasion in human placenta. *Exp Parasitol*. 2013; 133(1): 12-7.
- Ceccarelli D F, Song H K, Poy F, Schaller M D, Eck M J. Crystalstructure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 2006; 281(1): 252–25.
- Chaves AT, Menezes CAS, Costa HS, Nunes MCP, Rocha MOC. Myocardial fibrosis in chagas disease and molecules related to fibrosis. *Parasite Immunol*. 2019; 41:e12663. Review.
- Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. 1793, 911–920.
- Chu M, Iyengar R, Koshman Y, Kim T, Samarel AM. Endothelin-1 induces Serine 910 phosphorylation of focal adhesion kinase via PKCdelta-and Src-dependent signaling pathways. *FASEB J*. 2010; 24.
- Chu M, Iyengar R, Koshman YE, Kim T, Russell B, Martin JL, Heroux AL, Robia SL, Samarel AM. Serine-910 phosphorylation of focal adhesion kinase is critical for sarcomere reorganization in cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2011; 92 (3):409–419.
- Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res*. 2007; 101:1339–1348.
- Clemente CFMZ, Xavier-Neto J, Dalla Costa AP, Consonni SR, Antunes JE, Rocco SA, Pereira MB, Judice CC, Strauss B, Joazeiro PP, Matos-Souza JR, Franchini KG. Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic

- growth by activating the AKT and mTOR pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(2), 493–501.
- Collett MS, Erikson RL. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1978; 75:2021–2024.
- Conteh L, Engels T, Molyneux DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet* 2010; 375: 239–47.
- Cook JR, Carta L, Bénard L, Chemaly ER, Chiu E, Rao SK, et al. Abnormal muscle mechanosignaling triggers cardiomyopathy in mice with Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 2014; 124: 1329-39.
- Cooper LA, Shen TL, Guan JL. Regulation of focal adhesion kinase by its aminoterminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8030–41.
- Corral RS, Guerrero NA, Cuervo H, Gironès N, Fresno M. *Trypanosoma cruzi* infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(2):e2034.
- Coura JR, Vinãs PA. Chagas disease: a new worldwide challenge, *Nature.* 2010; 465, S6–S7.
- Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem.* 2006; 99:35–52.
- Crosara-Alberto DP, Inoue RY, Costa CRC. FAK signalling mediates NF-kappaB activation by mechanical stress in cardiac myocytes. *Clin Chim Acta.* 2009; 403(1-2):81-6.
- Cui S, Cui Y, Li Y, Zhang Y, Wang H, Qin W, Chen X, Ding S, Wu D, Guo H. Inhibition of cardiac hypertrophy by aromadendrin through down-regulating NFAT and MAPKs pathways. *Biochem Bioph Res Co.* 2018. 506(4): 805-811.
- Curtis-Roblesa R, Aucklanda LD, Snowdenb KF, Hamerc GL, Hamer AS. Analysis of over 1500 triatomine vectors from across the US, predominantly Texas, for *Trypanosoma cruzi* infection and discrete typing units. *Infection, Genetics and Evolution.* 2018; 171-180.
- De Bona E, Lidani KCF, Bavia L, Omidian Z, Gremski LH, Sandri TL, de Messias Reason IJ. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Front Immunol.* 2018; 6:9:1842.

- Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22: 147–56.
- Dias JCP. Facing Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(3):285-286.
- Dias JCP, Amato Neto V. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44 (2).
- Dias N, Carvalho B, Nitz N, Hagström L, Vital T, Hecht M. Congenital Chagas disease: alert of research negligence. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2019; 52: e20180069.
- Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDI). Doença de Chagas. Disponível em: [http:// https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/](http://https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/). Acessado em abril de 2020.
- Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDI). 2019. Disponível em: [https://www.dndial.org/2019/comunicacao-e-informacao/press-releases/estudo-mostra tratamento-muito-mais-curto-para-doenca-de-chagas/](https://www.dndial.org/2019/comunicacao-e-informacao/press-releases/estudo-mostra-tratamento-muito-mais-curto-para-doenca-de-chagas/). Acessado em maio de 2020.
- Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2014; 36: 377–87.
- Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, Samarel AM. Endothelin induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278:H1695–707.
- Eickhoff CS, Lawrence CT, Sagartz JE, Bryant LA, Labovitz AJ, Gala SS, Hoft DF. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *J. Parasitol.* 2010. 96, 758–764.
- Elias FE, Vigliano CA, Laguens RP, Levin MJ, Berek C. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68:242–247.
- Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica.* 2002; 81:123–132.
- FDA (Food and Drug Administration). 2017. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209570lbl.pdf. Acessado em maio de 2020.

- Fernandes HJ, Barbosa LOF, Machado TS, Campos JPR, Moura AS. Case Report: meningoencephalitis caused by reactivation of Chagas disease in patient without known immunosuppression. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 96(2): 292–294
- Ferreira ILM, Silva TPT. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: An historical fact. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(5): 507–9.
- Ferreira LR, Ferreira FM, Nakaya HI, Deng X, Cândido DD, de Oliveira LC, Billaud JN, Lanteri MC, Rigaud VO, Seielstad M, Kalil J, Fernandes F, Ribeiro AL, Sabino EC, Cunha-Neto E. Blood gene signatures of Chagas cardiomyopathy with or without ventricular dysfunction. *J Infect Dis.* 2017; 215:387–395.
- Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11 (11):802–814.
- Franchini K. Focal adhesion kinase — The basis of local hypertrophic signaling domains. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(2), 485–492. Review.
- Franchini K. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens.* 2001; 8:125-42.
- Franchini KG, Clemente CFMZ, Marin TM. Focal adhesion kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42: 44-52. Review.
- Franchini KG, Torsoni AS, Soares PHA, Saad MJA. Early Activation of the Multicomponent Signaling Complex Associated With Focal Adhesion Kinase Induced by Pressure Overload in the Rat Heart. *Circ. Res.* 2000; 87(7), 558–565.
- Freeman BD, Machado FS, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life Sci.* 2014; 24;118(2):110-9. Review.
- Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: A new therapeutic target? *Circulation*, 2004; 109(13): 1580–89.
- Furuta Y, Ilic D, Kanazawa S, Takeda N, Yamamoto T, Aizawa S. Mesodermal defect. in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene.* 1995; 11:1989–95.

- Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2003;22(4):359-74.
- Garcia S, Ramos CO, Senra JFV, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-dos-Santos R, Soares, MBP. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(4): 1521–1528.
- Gervais FG, Thornberry NA, Ruffolo SC, Nicholson DW, Roy S. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *J Biol Chem.* 1998; 273: 17102-8.
- Glenn DJ, Rahmutula D, Nishimoto M, Liang F, Gardner DG. Atrial natriuretic peptide suppresses endothelin gene expression and proliferation in cardiac fibroblasts through a GATA4-dependent mechanism. *Cardiovasc Res.* 2009; 84(2): 209–217.
- Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. *Infect Immun.* 2003;1185–1193.
- Graham ZA. Integrin Signaling at 2hr and 48hr Post-Eccentric Exercise in Heat Treated Rat Skeletal Muscle. https://www.researchgate.net/figure/General-Integrin-Signaling-Pathway-and-Heat-Shock-Proteins-Mechanotransduction-and_fig2_47277637. Acessado em dezembro de 2020.
- Grigera PR, Jeffery ED, Martin KH, Shabanowitz J, Hunt DF, Parsons JT. FAK phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *J Cell Sci.* 2005; 118:4931–4935.
- Guarner J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol.* 2019; 36:164–169. Review.
- Guarner J, Bartlett J, Zaki S, Colley D, Grijalva M, Powell M. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65:152–158.
- Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. – Rio de Janeiro: PANAFTOSA-

- VP/OPAS/OMS, 2009. 92; Serie de Manuais Técnicos, 12. PAHO/HSD/CD/539.09
- Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA*.1992; 89:8487–91.
- Harston RK, Kuppuswamy D. Integrins Are the Necessary Links to Hypertrophic Growth in Cardiomyocytes. *J Signal Transduct*. 2011; 2011: 521742. Review.
- Hassan GS, Mukherjee S, Nagajyothi F, Weiss LM, Petkova SB, de Almeida CJ, Huang H, Desruisseaux MS, Bouzahzah B, Pestell RG, Albanese C, Christ GJ, Lisanti MP, Tanowitz HB. *Trypanosoma cruzi* infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells. *Infect Immun*. 2006; 74(1):152–9.
- He Q, Mendez M, LaPointe MC. Regulation of the human brain natriuretic peptide gene by GATA-4. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283:E50e7.
- Healy C, Viles-Gonzalez JF, Sáenz LC, Soto M, Ramírez JD, d'Avila A. Arrhythmias in chagasic cardiomyopathy. *Card Electrophysiol Clin*. 2015; 7(2):251-68.
- Heineke J, Molkentin JD: Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006; 7(8): 589–600.
- Henriques C, Henriques-Pons A, Meuser-Batista M, Ribeiro AS, de Souza W. In vivo imaging of mice infected with bioluminescent *Trypanosoma cruzi* unveils novel sites of infection. *Parasites & Vectors*. 2014; 7(89).
- Hernández M, Wicz S, Santamaría MH, Corral RS. Curcumin exerts anti-inflammatory and vasoprotective effects through amelioration of NFAT-dependent endothelin-1 production in mice with acute Chagas cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 16;113(9):e180171.
- Hernández M, Wicz S, Corral RS. Cardioprotective actions of curcumin on the pathogenic NFAT/COX-2/prostaglandin E 2 pathway induced during *Trypanosoma cruzi* infection. *Phytomedicine*. 2016. 15;23(12):1392-1400.
- Heusch G, Libby P, Gersh B, Yellon D, Böhm M, Lopaschuk G, Opie L. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *The Lancet*. 2014; 383(9932): 1933–1943.
- Hirth S, Bühler A, Bührdel JB, Rudeck S, Dahme T, Rottbauer W, Just S. Paxillin and Focal Adhesion Kinase (FAK) Regulate Cardiac Contractility in the Zebrafish Heart. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0150323.

- Hoffman KA, Reynolds C, Bottazzi ME, Hotez P, Jones K. Improved Biomarker and Imaging Analysis for Characterizing Progressive Cardiac Fibrosis in a Mouse Model of Chronic Chagasic. *J AM Heart Assoc.* 2019; 8(22): e013365.
- Huang H, Petkova SB, Cohen AW, Bouzahzah B, Chan J, Zhou J, Factor SM, Weiss LM, Krishnamachary M, Mukherjee S, et al. Activation of Transcription Factors AP-1 and NF- B in Murine Chagasic Myocarditis. *Infect Immun.* 2003; 71(5): 2859–2867.
- Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC: Basic to Translational Science.* 2019; 4(3): 449–467.
- Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 2007; 179:1043-1057.
- Hunter T. Signaling-2000 and Beyond. *Cell.* 2000; 100:113–27.
- Ianni BM, Mady C. The sugarcane juice was delicious, but... *Arq Bras Cardiol.* 2005; 85:379–81.
- Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39:1384–91.
- Iijima Y, Laser M, Shiraishi H, Willey CD, Sundaravadivel B, Xu L, McDermott PJ, Kuppuswamy D. c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *J Biol Chem.* 2002; 277 (25). 23065–23075.
- Informativo GT-Chagas (Ministério da Saúde). 2019. Edição 6. Disponível em: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/26/Informativo-Gt-Chagas-2019---6a-edi---o-.pdf>. Acessado em maio de 2020.
- Íñiguez, M. A., Martínez-Martínez, S., Punzón, C., Redondo, J. M., & Fresno, M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2000; 275(31):23627–35.
- Jackson Y, Wyssa B, Chappuis F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemoth.* 2020; 75(3): 690–696.

- Jelicks LA, Tanowitz HB. Advances in imaging of animal models of Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2011; 75:193-208.
- Jiménez P, Jaimes J, Poveda C, Ramírez JD. A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitol.* 2018; 1–15.
- Johnston RK, Balasubramanian S, Kasiganesan H, Baicu CF, Zile MR, Kuppuswamy D. β 3 integrin-mediated ubiquitination activates survival signaling during myocardial hypertrophy. *FASEB J.* 2009.; 23 (8), 2759–2771.
- Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today.* 1996; 12:396–399.
- Kannel WB, Dannenberg AL, Levy D: Population implications of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol*, 1987; 60(17): 85I–93I.
- Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(8):457-473. Review.
- Kerkelä R., Ulvila J, Magga J. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4(10): e002423.
- Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD. Focal Adhesion Kinase Signaling In Unexpected Places. *Curr Opin Cell Biol.* 2017; 45: 24–30.
- Klotz SA, Dorn PL, Mosbacher M, Schmidt JO. Kissing Bugs in the United States: Risk for Vector-Borne Disease in Humans. *Environ Health Insights.* 2014; 8(Suppl 2): 49–59.
- Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1992; 267:23439–42.
- Kovačić-Milivojević B, Roediger F, Almeida EAC, Damsky CH, Gardner DG, Ilić D. Focal Adhesion Kinase and p130Cas Mediate Both Sarcomeric Organization and Activation of Genes Associated with Cardiac Myocyte Hypertrophy. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(8): 2290–2307.
- Kratz JM, Garcia Bournissen F, Forsyth CJ, Sosa-Estani S. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2018. 11, 943–957.

- Kuppuswamy D, Kerr C, Narishige T, Kasi VS, Menick DR, Cooper GT. Association of tyrosine-phosphorylated c-Src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. *J Biol Chem*. 1997; 272:4500–8.
- Lal H, Verma SK, Foster DM, Golden HB, Reneau JC, Watson LE, Singh H, Dostal DE. Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease. *Front. Biosci*. 2009; 14: 2307-2321.
- Lambers C, Roth M, Zhong J, Campregher C, Binder P, Burian B, Petkov V, Block L-H. The Interaction of Endothelin-1 and TGF- β 1 Mediates Vascular Cell Remodeling. *PLoS ONE*. 2013; 8(8): e73399.
- Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1015:53-70.
- Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*. 1956; 14: 1035–60.
- Lazzeroni, D., Rimoldi, O., & Camici, P. G. From Left Ventricular Hypertrophy to Dysfunction and Failure. *Circulation Journal*. 2016; 80(3), 555–564.
- Lee BY, Bartsch SM, Skrip L, Hertenstein DL, Avelis CM, Ndeffo-Mbah M, Tilchin C, Dumonteil EO, Galvani A. Are the London Declaration's 2020 goals sufficient to control Chagas disease?: Modeling scenarios for the Yucatan Peninsula. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(3): e0006337.
- Liang Y, Sheikh F. Scaffold Proteins Regulating Extracellular Regulated Kinase Function in Cardiac Hypertrophy and Disease. *Front. Pharmacol*. 2016; 7-37.
- Libisch MG, Faral-Tello P, Garg NJ, Radi R, Piacenza L, Robello C. Early *Trypanosoma cruzi* Infection Triggers mTORC1-Mediated Respiration Increase and Mitochondrial Biogenesis in Human Primary Cardiomyocytes. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1889.
- Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*. 2019; 7: 166.
- Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell*. 2007; 129:1177–87.
- Liu G, Ma C, Yang H, Zhang PY. Transforming growth factor β and its role in heart disease. *Exp Ther Med*. 2017; 13(5): 2123–2128. Review.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
- London Conference on The Illegal Wildlife Trade. 12-13. 2014. Disponível em: <https://cites.org/sites/default/files/eng/news/sundry/2014/london-wildlife-conference-declaration-140213.pdf>
- Lopes MM, Ribeiro GC, Tornatore TF, Clemente CF, Teixeira VP, Franchini KG. Increased expression and phosphorylation of focal adhesion kinase correlates with dysfunction in the volume-overloaded human heart. *Clin Sci (Lond)*. 2007; 113:195–204.
- López-Vélez R, Norman F F, Bern C. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)*. 2020; 103, 762-775.
- Lorenz K, Schmitt JP, Vidal M, Lohse MJ. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2-signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009;41, 2351–2355.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-75.
- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor 1 in Mouse Postnatal Growth. *Dev. Biol*. 2001; 229(1): 141–162.
- Lyon RC, Zanella F, Omens JH, Sheikh F. Mechanotransduction in Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circ. Res*. 2015. 116(8), 1462–1476.
- Machado FS, Dutra WO, Esper L, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012; 34: 753–70.
- Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000; 102:3003-8.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002; 298:1912–34.
- Marin TM, Clemente CF, Santos AM, Picardi PK, Pascoal VD, Lopes-Cendes I, Saad MJA, Franchini KG. Shp2 negatively regulates growth in cardiomyocytes

- by controlling focal adhesion kinase/Src and mTOR pathways. *Circ Res.* 2008; 103:813–24.
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007; 115:1109–23.
- Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet.* 2013; 381(9862), 242–255.
- Maron J.M., Towbin J.A., Thiene G., Antzelevitch C., Corrado D. et al. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Circulation*, 2006; 113:1807-1816.
- Martínez PT, Navajas PL, Lietha D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules.* 2020; 10(2): 179. Review.
- Martins-Melo F, Carneiro M, Ramos Jr A, Heukelbach J, Ribeiro A, Werneck G. The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990–2016: a subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12.
- Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. *Bull World Health Organ.* 2016; 94:103–110.
- Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends. Pharmacol Sci.* 2004; 25(4):219–24.
- Matsuda M, Matsuda Y. Mechanism of left a trial enlargement related to ventricular diastolic impairment in hypertension. *Clin. Cardiol.*1996; 19:954-959.
- McCance KL, Huether SE. Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children. Brashers VL and Rote NS (eds). 7th edition. Elsevier, 2014.
- Mehra MR, Uber PA, Francis GS: Heart failure therapy at a crossroad: Are there limits to the neurohormonal model? *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41(9): 1606–10.
- Melo TG, Adesse D, Meirelles M de N, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi* down-regulates mechanosensitive proteins in cardiomyocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019; 114: e180593.

- Melo TG, Almeida DS, de Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* infection disrupts vinculin costameres in cardiomyocytes. *Eur J Cell Biol.* 2004; 83(10): 531-40.
- Menon B, Johnson JN, Ross RS, Singh M, Singh K. Glycogen synthase kinase-3 β plays a pro-apoptotic role in β -adrenergic receptor-stimulated apoptosis in adult rat ventricular myocytes: Role of β 1 integrins. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(3): 653-661.
- Messenger LA, Bern C. Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31(5):415-421.
- Mijares A, Espinosa R, Adams J, Lopez JR. Increases in [IP3]i aggravates diastolic [Ca2+] and contractile dysfunction in Chagas' human cardiomyocytes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020; 14(4): e0008162.
- Miller ML, Jensen LJ, Diella F, Jørgensen C, Tinti M, Li L, Hsiung M, Parker SA, Bordeaux J, Sicheritz-Ponten T, et al. Linear motif atlas for phosphorylation-dependent signaling. *Sci Signal* 1: ra2, 2008.
- Ministério da Saúde. Doença de Chagas. 2020. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6:56–68.
- Mohanty P, Bhatnagar S. In Silico Screening to Identify Inhibitors of Growth Factor Receptor 2–Focal Adhesion Kinase Interaction for Therapeutic Treatment of Pathological Cardiac Hypertrophy. 2019. *Assay Drug Dev Technol.* 2019; 17(2):58-67. Review.
- Mohanty P, Bhatnagar S. Structural basis of focal adhesion targeting domain-mediated signaling in cardiac hypertrophy. *J Recept Sig Transd.* 2016; 37(1), 38–50.
- Mohanty P, Bhatnagar S. Structure of focal adhesion kinase in healthy heart versus pathological cardiac hypertrophy: A modeling and simulation study. *J Mol Graph Model.* 2018; 80: 15–24.
- Molina HA, Milei J, Rimoldi MT, Gonzalez Cappa SM, Storino RA. Histopathology of the heart conducting system in experimental Chagas disease in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82: 241–246.
- Molina I, Prat JG., Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezós J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa

- A. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2014. 370(20), 1899–1908.
- Molkentin J. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res.* 2004; 63(3): 467–475.
- Molyneux D. The London Declaration on Neglected Tropical Diseases: 5 years on. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2016; 110: 623–625.
- Morilla MJ, Romero EL. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine.* 2015; 10 (3):465–481.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015. 373(14), 1295–1306.
- Morillo, CA, Waskin H, Sosa-Estani S, del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, Mallagray M, Apt W, Beloscar J, Gascon, J, et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017; 69(8), 939–947.
- Morris S, Tanowitz H, Hatcher V, Bilezikian J, Wittner M. Alterations in intracellular calcium following infection of human endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1988; 29(2-3), 213–221.
- Murphy JM, Park H, Lim S-T S. FAK and Pyk2 in disease. *Front. Biol.* 2016; 11(1): 1–9. Review.
- Nadruz Jr W, Corat MA, Martin TM, Guimaraes Pereira GA, Franchini KG. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. *Cardiovasc Res.* 2005; 68:87–97.
- Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Re. Cardiol.* 2018; 15(7), 387–407. Review.
- Nakayama H, Bodi I, Maillet M, DeSantiago J, Domeier TL, Mikoshiba K, Lorenz JN, Blatter LA, Bers DM, Molkentin JD. The IP3 receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli. *Circ Res.* 2010; 3:107(5):659-66.
- Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverría LE, Dutra WO, Gascon J, Morillo CA, Oliveira-Filho J, Ribeiro ALP, Marin-Neto JA; American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young;

- Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Stroke Council. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2018; 138(12):e169-e209.
- Ossovskaya V, Lim ST, Ota N, Schlaepfer DD, Ilic D. FAK nuclear export signal sequences. *FEBS Letters*, 582(16), 2402–2406.
- Olivera MJ, Fory JÁ, Porras JF, Buitrago G. Prevalence of Chagas disease in Colombia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019; 14(1): e0210156.
- O'Neill BT, Abel ED. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest* 2005; 115:2059– 64.
- Oudit GY, Penninger JM. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovasc Res*. 2009; 82(2): 250–260.
- Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease, *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 37: 449-471.
- Pan American Health Organization. General Information – Chagas Disease. 2011. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedadchagas&Itemid=0&lang=en. Acessado em abril de 2020.
- Parker RC, Varmus HE, Bishop JM. Cellular homologue (c-src) of the transforming gene of Rous sarcoma virus: isolation, mapping, and transcriptional analysis of c-src and flanking regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981;78: 5842–5846.
- Parsons J T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*. 2003; 116(8): 1409–1416.
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, et al. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 2004; 118:375– 87.
- Peng X, Wu X, Druso JE, Wei H, Park AY, Kraus MS, et al. Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:6638–43

- Pengue C, Cesar G, Alvarez MG, Bertocchi G, Lococo B, Viotti R, Natale MA, Castro Eiro MD, Cambiazzo SS, Perroni N, Nuñez M, Albareda MC, Laucella SA. Impaired frequencies and function of platelets and tissue remodeling in chronic Chagas disease. *PLoS One*. 2019; 14;14(6):e0218260.
- Pereira Barretto AC, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML, Bellotti G, Pileggi F. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J*. 1986; 111:307–312.
- Pereira NS, Queiroga TBD, Nunes DF, Andrade CM, Nascimento MSL, Do-Valle-Matta MA, Câmara ACJ, Galvão LMC, Guedes PMM, Chiari E. Innate immune receptors over expression correlate with chronic chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(7), e0006589.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2018; 391: 82–94.
- Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. Toll-Like Receptor 2 Regulates Interleukin-1 β -Dependent Cardiomyocyte Hypertrophy Triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2005; 73(10): 6974–6980.
- Petkova SB, Huang H, Factor SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, Weiss LM, Douglas SA, Wittner M, Tanowitz HB. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol*. 2001;31(5-6):499-511.
- Petkova SB, Tanowitz HB, Magazine HI, Factor SM, Chan J, Pestell RG, Bouzahzah B, Douglas SA, Shtutin V, Morris SA, Tsang E, Weiss LM, Christ GJ, Wittner M, Huang H. Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cardiovasc Pathol*. 2000; 9(5):257–65.
- Pittella JEH. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103: 973–978.
- Poveda C, Fresno M, Gironès N, Olindo Assis MF, Ramirez JD, Santi-Rocca, J, Marin Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). *PLoS One* 2014; 9: e91154.
- Powell M, Morgan J, Guarner J, Colley D. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1998; 20:463–471.
- Proud C. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004; 63(3): 403–413. Review.

- Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol.* 2000; 23: 883–89.
- Rassi A, Marcondes de Rezende J, Luquetti AO, Rassi Jr A. Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. *American Trypanosomiasis.* 2010; 709-741.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010; 375(9723):1388–402.
- Rassi A, Rassi A Jr, Rassi SG, et al. Doença de Chagas. In: Lopes AC, editor. Tratado de clínica médica. 2ª edição. São Paulo (Brasil): Editora Roca; 2009. 4123–34;
- Rassi A Jr, Rassi A, Rezende JM. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin N Am.* 2012; 26:275–291.
- Rassi A Jr, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 76: 75–96.
- Report of 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation.* 1996; 93: 841-1.
- Rial MS, Scalise ML, Arrúa EC, Esteva MI, Salomon CJ, Fichera LE. Elucidating the impact of low doses of nano-formulated benznidazole in acute experimental Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(12): e0006119.
- Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, Pirmez C, Da-Cruz AM, Pinto EF. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun.* 2014; 82(12):5203-13.
- Rigazio, CS, Hernández M, Corral RS. Cardiopathogenic mediators generated by GATA4 signaling upon co-activation with endothelin-1 and *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbial Pathogenesis.* 2014; 73, 47–52.
- Roca-Cusachs P, del Rio A, Puklin-Faucher E, Gauthier NC, Biais N, Sheetz MP. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by alpha-actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. 110:E1361-1370.
- Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol.* 2012; 361730.

- Rodríguez-Pascual F, Busnadiego O, González-Santamaría J. The profibrotic role of endothelin-1: Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? *Life Sciences*. 2014; 118(2): 156–164.
- Roffe E & Murphy PM. *Autoimmunity and the Paradox of Chagas Disease. The Microbiome in Rheumatic Diseases and Infection*. 2018; 139–147.
- Roman-Campos D, Sales-Junior P, Duarte HL, Gomes ER, Lara A, Campos P, Rocha NN, Resende RR, Ferreira A, Guatimosim S, Gazzinelli RT, Ropert C, Cruz JS. Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: Role of PI3Kinase/NO axis. *Int. J. Cardiol*. 2013. 167(6), 3011–3020.
- Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012; 66: 105-143.
- Ross RS, Borg TK. Integrins and the Myocardium. *Circ Res*. 2001; 88(11):1112–1119.
- Ross TD, Coon BG, Yun S, Baeyens N, Tanaka K, Ouyang M, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2013; 25(5):613-8.
- Rozengurt E. Signaling Pathways Induced by G-protein-coupled Receptors. *Physiology of the Gastrointestinal Tract* .2012. (Fifth Edition).
- Rysa J, Tenhunen O, Serpi R, Soini Y, Nemer M, Leskinen H, et al. GATA-4 is an angiogenic survival factor of the infarcted heart. *Circ Heart Fail*. 2010;3: 440e50.
- Sadoshima J-I, Malhotra R, Izumo S. The role of the cardiac renin-angiotensin system in load-induced cardiac hypertrophy. *J Card Fail*. 1996; 2: S1–S6.
- Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation*. 1996; 93:1214–1222.
- Salles G, Xavier S, Sousa A, Hasslocher-Moreno A, Cardoso C. Prognostic Value of QT Interval Parameters for Mortality Risk Stratification in Chagas' Disease: Results of a Long-Term Follow-Up Study. *Circulation*. 2003; 108(3): 305–312.
- Salomone OA, Caeiro TF, Madoery RJ, Amuchástegui M, Omelinauk M, Juri D, Kaski JC. High plasma immunoreactive endothelin levels in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2001; 87:1217-20.
- Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, Zerouh M, Bastian S, Farag M, Popov AF, Dohmen PM, Choi YH, Wahlers T, Weymann A. Cardiac Hypertrophy: An

- Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016; 22: 75–79.
- Samarel AM. Focal Adhesion Signaling in Heart Failure. *Pflugers Arch.* 2014; 466(6): 1101–1111. Review.
- Samuels F, Pose RR. Why neglected tropical diseases matter in reducing poverty. *Development Progress* 2013; Working paper 03.
- Sanna B, Bueno OF, Dai YS, Wilkins BJ, Molkentin JD. Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(3):865-78.
- Santos V, Meis J, Savino W, Andrade JAA, Vieira J, Coura JR, Junqueira, ACV. Acute Chagas disease in the state of Para, Amazon region: is it increasing? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113(5):e170298.
- Saucerman JJ, Tan PM, Buchholz, KS, McCulloch AD, Omens JH. Mechanical regulation of gene expression in cardiac myocytes and fibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2019; 16, 361–378.
- Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J. Cell Sci.* 2010; 123:1007-1013.
- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:5192–6.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp 125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:1680–8.
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P: Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 1994; 372:786–791.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(Suppl. I): 75-85.
- Silva BV, Horta BAC, Alencastro RB, Pinto AC. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quím. Nova.* São Paulo. 2009; 32 (2).
- Silvério JC, Pereira IR, Cipitelli M da C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. CD8+ T-Cells Expressing Interferon Gamma or Perforin

- Play Antagonistic Roles in Heart Injury in Experimental *Trypanosoma cruzi*-Elicited Cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4): e1002645.
- Simões MV, Romano MMD, Schmidt A, Martins KSM, Marin-Neto JA. Chagas Disease Cardiomyopathy. *Int J Cardiovasc Sci.* 2018;31(2)173-189. Review.
- Souza DSM, Araujo MTF, Santos PRSG, JCB Furtado, Figueiredo MTS, Povoá RMS. Anatomopathological Aspects of Acute Chagas Myocarditis by Oral Transmission. *Arq. Bras. Cardiol.* 2016; 107(1):77-80.
- Souza RCM, Soares AC, Alves CL, Lorosa ES; Pereira MH; Diotaiuti L. Feeding behavior of *Triatoma vitticeps* (Reduviidae: Triatominae) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106 (1): 16-22.
- Stage B Structural heart disease without signs or symptoms of heart failure (HF). Disponível em: http://www.rnceus.com/CHF_16/stageB.html. Acessado em abril de 2020.
- Stein R, Trujillo JP, Silveira ADD, Lamounier Jr A, Iglesias LM. Genetic Evaluation, Familial Screening and Exercise. *Arq. Bras Cardiol.* 2017;108 (3) 263-270.
- Stutchbury B, Atherton P, Tsang R, Wang DY, Ballestrem C. Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *Journal of Cell Science.* 2017; 130(9), 1612–1624.
- Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol.* 2016. 21;215(4):445-456.
- Swynghedauw, B. Darwinian evolution and cardiovascular remodeling. *Heart Fail. Rev.* 2016; 21, 795–802.
- Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loredó ML, Weiss LM, Factor SM, Shtutin V, Mukherjee S, Kitsis RN, Christ GJ, Wittner M, Shirani J, Kisanuki YY, Yanagisawa M. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun.* 2005; 73(4): 2496-503.
- Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2001; 31 (5-6): 550-554. Review.
- Tarleton RL, Gürtler RE, UrbinA JA, Ramsey J, Viotti R. Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 2014. 8, e3219.
- Theodosiou M, Widmaier M, Böttcher RT, Rognoni E, Veelders M, Bharadwaj M, Lambacher A, Austen K, Müller DJ, Zent R, Fässler R. Kindlin-2 cooperates

- with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *ELife*. 2016;5:e10130.
- Torrice F, Gascon J, Ortiz L, Cristina Alonso-Veja C, Pinazo MJ, Schijman A, Almeida IC, Alves F, Strub-Wourgaft N, Ribeiro I. Treatment of Adult Chronic Indeterminate Chagas Disease With Benznidazole and Three E1224 Dosing Regimens A Proof-Of-Concept, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet*. 2018; 18(4), 419-430.
- Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz Jr W, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2003; 93:140–7.
- Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, Franchini KG. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol-Heart C*. 2005; 289(4): H1488–H1496.
- Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the non isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1994; 269(34):21778–85.
- Vadali K, Cai X, Schaller MD. Focal adhesion kinase: an essential kinase in the regulation of cardiovascular functions. *IUBMB Life*. 2007; 59(11):709-16.
- Wang Y, Tang Y, Zou Y, Wang D, Zhu L, Tian T, Wang, J, Bao J, Hui R, Kang L, Song L, Wang J. Plasma level of big endothelin-1 predicts the prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol*. 2017; 243, 283–289.
- Wermuth PJ, Li Z, Mendoza FA, Jimenez AS. Stimulation of Transforming Growth Factor- β 1-Induced Endothelial-To-Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis by Endothelin-1 (ET-1): A Novel Profibrotic Effect of ET-1. *PLoS One*. 2016; 11(9): e0161988.
- Wilcox-Adelman SA, Denhez F, Goetinck PF. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem*. 2002; 277(36):32970-7.
- World-Health-Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(americantrypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(americantrypanosomiasis)). Acessado em Janeiro, 2020.
- World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec*. 2015; 90 (6):33–43.

- World Health Organization. London Declaration. 2012; Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/London_Declaration_NTDs.pdf?ua=. Acessado em Julho, 2014.
- Xiang M, Luo H, Wu J, Ren L, Ding X, Wu C, Chen J, Chen S, Zhang H, Yu L, Zou Y, Xu H, Ye P, Chen M, Xia J. ADAM23 in Cardiomyocyte Inhibits Cardiac Hypertrophy by Targeting FAK-AKT Signaling. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7(18): e008604.
- Xie Y, Han KH, Grainger N, Li W, Corrigan RD, Perrino BA. A role for focal adhesion kinase in facilitating the contractile responses of murine gastric fundus smooth muscles. *J Physiol.* 2018; 596(11):2131–2146.
- Yamamoto K, Dang QN, Maeda Y, Huang H, Kelly RA, Lee RT. Regulation of cardiomyocyte mechanotransduction by the cardiac cycle. *Circulation.* 2001;103: 1459–64.
- Yan K, Wang K, Li P. The role of post-translational modifications in cardiac hypertrophy. *J Cell Mol Med.* 2019;1–13. Review.
- Yang LL, Gros R, Kabir MG, Sadi A, Gotlieb AI, Husain M, Stewart DJ. Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation.* 2004;109(2): 255-61.
- Zeitz MJ, Smyth JW. Translating Translation to Mechanisms of Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2020; 10;7(1).
- Zhang J, Fan G, Zhao H, Wang Z, Li F, Zhang P, Zhang J, Wang X, Wang W. Targeted inhibition of Focal Adhesion Kinase Attenuates Cardiac Fibrosis and Preserves Heart Function in Adverse Cardiac Remodeling. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 43146.
- Zhao H, Wang W, Zhang J, Liang T, Fan G-P, Wang Z-W, Zhang P-D, Wang X, Zhang J. Inhibition of osteopontin reduce the cardiac myofibrosis in dilated cardiomyopathy via focal adhesion kinase mediated signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2016; 8(9): 3645–3655.
- Zhao X-K, Cheng Y, Liang Cheng M, Yu L, Mu M, Li H, Liu Y, Zhang B, Yao Y, Guo H, Wang R, Zhang Q. Focal Adhesion Kinase Regulates Fibroblast Migration via Integrin beta-1 and Plays a Central Role in Fibrosis. *Sci Rep.* 2016; 6(1): 19276.
- Zhou J, Yi Q, Tang L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019. 38(1):205.



Sociedade
Brasileira de
Infectologia

The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES


www.elsevier.com/locate/bjid



Original article

Role of FAK signaling in chagasic cardiac hypertrophy



Amanda R. Tucci^a, Francisco O. R. de Oliveira Jr^a, Guilherme C. Lechuga^a, Gabriel M. Oliveira^b, Ana Carolina Eleuterio^a, Liliâne B. de Mesquita^a, Priscila S.G. Farani^c, Constança Britto^c, Otacílio C. Moreira^c, Mirian Claudia S. Pereira ^{a,*}

^a Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Ultraestrutura Celular, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Celular, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2020

Accepted 16 August 2020

Available online 12 September 2020

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Cardiac hypertrophy

Endothelin-1

FAK signaling

ABSTRACT

Cardiac hypertrophy and dysfunction are a significant complication of chronic Chagas disease, with heart failure, stroke, and sudden death related to disease progression. Thus, understanding the signaling pathways involved in the chagasic cardiac hypertrophy may provide potential targets for pharmacological therapy. Herein, we investigated the implication of focal adhesion kinase (FAK) signaling pathway in triggering hypertrophic phenotype during acute and chronic *T. cruzi* infection. C57BL/6 mice infected with *T. cruzi* (Brazil strain) were evaluated for electrocardiographic (ECG) changes, plasma levels of endothelin-1 (ET-1) and activation of signaling pathways involved in cardiac hypertrophy, including FAK and ERK1/2, as well as expression of hypertrophy marker and components of the extracellular matrix in the different stages of *T. cruzi* infection (60–210 dpi). Heart dysfunction, evidenced by prolonged PR interval and decrease in heart rates in ECG tracing, was associated with high plasma ET-1 level, extracellular matrix remodeling and FAK signaling activation. Upregulation of both FAK tyrosine 397 (FAK-Y397) and serine 910 (FAK-S910) residues phosphorylation as well as ERK1/2 activation, lead to an enhancement of atrial natriuretic peptide gene expression in chronic infection. Our findings highlight FAK-ERK1/2 signaling as a regulator of cardiac hypertrophy in *Trypanosoma cruzi* infection. Both mechanical stress, induced by cardiac extracellular matrix (ECM) augment and cardiac overload, and ET-1 stimuli orchestrated FAK signaling activation with subsequent activation of the fetal cardiac gene program in the chronic phase of infection, highlighting FAK as an attractive target for Chagas disease therapy.

© 2020 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail address: mirian@ioc.fiocruz.br (M.C. Pereira).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.007>

1413-8670/© 2020 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Chagas disease (CD), a neglected tropical disease caused by *Trypanosoma cruzi*, is considered an important public health problem responsible for high rates of morbidity and mortality in Latin America.¹ Epidemiological surveillance has estimated that 8 million people are chronically infected worldwide, with more than 10,000 deaths per year.² Acute infection is mostly asymptomatic, whereas chronic infection may remain without signs (indeterminate form), in 60–70% of infected people, or progress to distinct clinical symptoms as neurological, digestive (megacolon and megaesophagus) and heart manifestations.^{3–5} Cardiomyopathy is a relevant manifestation of CD, affecting 30% of infected individuals, and endemic countries such as Brazil (1.2 million infected people) and Argentina (1.5 million infected people) concentrate 42% of all Chagasic cardiopathy cases.⁶ Cardiac damage is progressive and classified into different stages (A, B, C and D) according to the severity of cardiac dysfunction.⁷ Chronically infected individuals with an unaltered electrocardiogram (ECG) are considered in the indeterminate phase of CD (stage A) while disease progression leads to ECG abnormalities (stage B), including arrhythmias or conduction disorders (B1) and decreased left ventricular (LV) ejection fraction (B2), and also signs of heart failure (stage C and D).⁷ Sudden cardiac death due to CD cardiomyopathy reaches annual mortality rates between 0.2 and 19.2%,⁸ highlighting the urgency of managing this silent disease in public policies.

Myocardial hypertrophy, an important pathological outcome of chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), is an adaptative response to cardiac hemodynamic overload triggered by multifactorial processes, including cardiac injury due to severe myocarditis and fibrosis.⁹ Multiple signaling pathways, including NF- κ B, mediated by Toll-Like receptor 2 (TLR2) that modulates pro-inflammatory cytokines (IL-1 β),^{10,11} phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/AKT/Nitric oxide (NO) elicited by increased tumor necrosis factor- α (TNF- α) and/or NF- κ B¹² and also mitogen-activated protein kinase (MAPK) through extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2)^{13–15} or Ca²⁺/Calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent mechanism¹⁶ mediated by endothelin-1 (ET-1), have been implicated in the upstream signaling of cardiac hypertrophic effectors induced by *T. cruzi*, resulting in the activation of hypertrophic-responsive genes that regulate cardiac growth.¹⁷

ET-1, a vasoactive peptide that acts through G-protein coupled receptors (GPCRs), endothelin receptor A (ET_AR) and B (ET_BR), is overexpressed in both acute and chronic phases of CD showing elevated plasma levels and high cardiac tissue concentration.^{18,19} ET-1, that acts in an autocrine and paracrine manner, potentiates the pro-inflammatory process by up-regulating cellular adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and e-selectin), favoring immune system cell traffic and thereby exacerbating myocardial cell damage.¹⁷ Persistence of the parasite in the chronic phase of the disease modulates the inflammatory response that sustains high levels of ET-1, capable of inducing cardiac hypertrophy and fibrosis. A remarkable feature is that ET-1 also modulates hypertrophic phenotype in dilated idiopathic cardiomyopathy (DCM) triggered by focal

adhesion kinase (FAK).²⁰ However, the participation of the FAK signaling pathway in chagasic cardiac hypertrophy has yet not been evaluated.

FAK, a non-receptor protein tyrosine kinase essential for cardiac physiology, has emerged as a protagonist molecule of hypertrophy and heart failure.^{21,22} FAK signaling regulates mechanotransduction and sustains cardiac hemodynamics through integrin signaling pathway²³ but may also be activated through transmembrane receptors as heparan sulfate proteoglycans (HSPG)²⁴ and GPCRs,²⁵ the latter has been suggested as an activator of the hypertrophic response mediated by ET-1.²⁶ FAK is a multidomain scaffold protein composed of a band 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain, a central kinase domain and a focal adhesion targeting (FAT) domain. The autophosphorylation of FAK tyrosine residue 397 (Y397) triggers the recruitment and activation of Src-kinase family amplifying kinase activity through the phosphorylation of other tyrosine residues (Y576/577, Y861 and Y925), regulating biological events as adhesion, migration, proliferation, and survival.^{27,28} Additionally, FAK serine residues phosphorylation (S722, S843, S846, and S910) modulates hypertrophic response²⁹ and, interestingly, ET-1 is a key inducer of FAK-S910 phosphorylation promoting sarcomere reorganization and cardiac hypertrophy,²⁰ thus raising questions about the role of FAK signaling cascade in triggering chagasic cardiac hypertrophy.

In this study, we evaluated whether FAK signaling may act as a regulator of cardiac hypertrophy in Chagas cardiomyopathy. FAK activation was assessed by FAK-Y397 and FAK-S910 phosphorylation and its downstream effector in both acute and chronic phases of the murine model of *T. cruzi* infection.

Materials and methods

T. cruzi experimental infection

C57BL/6 lineage male mice (15–20 g), obtained from the Institute of Science and Technology in Biomodels (ICTB, Fiocruz), were housed at a maximum of five animals per cage, kept in a specific-pathogen-free (SPF) room at 20–22 °C under a 12/12 h light/dark cycle, 50–60% humidity and provided sterilized water and chow *ad libitum*. All experimental animal procedures were performed following the license (L-015/2017) approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Oswaldo Cruz Institute (CEUA/IOC) and also following Brazilian Law 11.794/2008 and regulations of the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA). In order to preserve animal welfare, a daily observation was supervised by a PhD veterinary doctor aiming to avoid animal suffering and pain. Animals were humanely euthanized whenever early endpoints of animal suffering became apparent such as motor disturbance, exploratory activity and/or moribund condition.

A total of 42 mice was divided into two groups: noninfected (12) and *T. cruzi*-infected (30) animals. Mice were intraperitoneally (i.p.) infected with trypomastigotes forms of *T. cruzi* Brazil strain (10⁵ parasites/animal), while noninfected animals were inoculated with sterile phosphate-buffered saline (PBS). Parasitemia was evaluated by Pizzi-Brener method.³⁰ Briefly, fresh blood samples (5 μ L) were collected by the incision of

Table 1 – Primers and standard curve parameters for hypertrophic marker amplification in C57Bl/6 mice infected with *Trypanosoma cruzi*.

Mouse gene target	Primer sequences	Reference	Amplicon length	Slope	Intercept	Coefficient of linearity (r ²)	Amplification efficiency (%)
GAPDH	Fw 5'-GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG-3' Rv 5'-TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG-3'	Ribeiro-Romão et al. [50]	169 bp	-3.34	11.71	0.99	99.3
HPRT	Fw 5'-TCCCAGCGTCGTGATTAGCGATG-3' Rv 5'-GGCCACAATGTGATGGCCTCCC-3'	Barreto-Albuquerque [51]	178 bp	-3.44	21.15	0.98	95.3
ANP	Fw 5'-GGATTCAAGAACCTGCTAGACC-3' Rv 5'-CGTCTCTCAGAGGTGGGTTG-3'	This study	167 bp	-3.27	19.69	0.99	102.1

the tail vein and examined by light microscopy. The circulating parasite load was monitored daily from 5th day of infection until 50 days post-infection (dpi). Acute infection (30–60 dpi) was determined by positive parasitemia and tissue parasitism. The surviving animals were monitored during the course of the chronic infection (90–210 dpi).³¹ The heart was harvested from both noninfected and *T. cruzi*-infected mice from 60 to 210 days. After longitudinally sectioned, half of the cardiac tissue was cryopreserved with Tissue-Tek for immunohistochemical analysis and the remaining tissue was fragmented and processed for protein and RNA extraction. Two independent experiments were performed.

Electrocardiographic analysis

Electrocardiographic parameters were evaluated in non-sedated mice by using transducers carefully placed under the skin, in accordance with a chosen preferential derivation (DII). Traces were recorded with a digital system (Power Lab 2/20) connected to a bio-amplifier at 2 mV for 1 s (PanLab Instruments). The filters were standardized between 0.1 and 100 Hz, and the traces were analyzed by using Scope software for Windows V3.6.10 (PanLab Instruments). We measured cardiac frequency (beats per minute, bpm) and duration of the PR, QRS, and QT intervals in milliseconds (ms) through (i) P wave: atrium chambers, (ii) PR interval: atrioventricular electric conduction, (iii) QRS interval: ventricular depolarization, (iv) QT interval: heart repolarization, and (v) heart rate, corresponding to the cardiac frequency (bpm). Moreover, ECG traces allowed for a qualitative analysis of heart rate changes (arrhythmias). We individually assessed the relations between the QT interval and the RR interval to obtain physiologically relevant values for heart rate-corrected QT interval (QTc) by giving a normalized RR interval ($RR100 = RR/100$ ms). Next, the value of the exponent (y) in the formula $QT0 = QTc \times RRy100$ was assessed, in which QT0 is the observed QT and both QT and QTc are given in milliseconds (ms). By taking the natural logarithm of each side of the formula ($QT0 = \ln(QTc) + y \ln(RR100)$), the slope of the linear relation between the log-transformed QT and RR100 thus defined the exponent to which the RR

interval ratio should be raised to correct the QT for the heart rate.³²

Indirect immunofluorescence

Samples of cardiac tissue, from both noninfected and *T. cruzi*-infected mice, were frozen in Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura, Zoeterwoude, The Netherlands) and stored in liquid nitrogen. Heart cryosections were fixed in cold acetone, air-dried and stored at -20 °C. Sections were washed in PBS and then blocked with PBS containing 4% serum albumin bovine (BSA; PBS + BSA) before immunostaining. The samples were incubated overnight at 4 °C with anti-fibronectin (1:600, Sigma Chemical Co., St Louis - USA) or type 1 Collagen (1:400; Life Technologies Co., Carlsbad, CA - USA) antibodies followed by washing with PBS + BSA. The antigen-antibody complex was detected by incubation for 1 h at 37 °C with TRITC-conjugated secondary antibody (1:400, Sigma). After washing, the sections were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a DNA staining, and mounted with the anti-fading DABCO® (Sigma). Images were acquired under a Zeiss Axio Imager M2 fluorescence microscope using AxioVision (Zeiss) digital image processing software.

For the type I collagen bioimage analysis, at least five different fields were captured from each group (uninfected and infected), and fluorescence images were segmented and the mean intensity measured using Knime workflow.³³

Protein extraction and immunoblotting assays

Noninfected and *T. cruzi*-infected cardiac tissue fragments were extracted with lysis buffer (Tris 50mM, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, pH 8.0) containing protease ([4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl-fluoride hydrochloride (AEBSF), aprotinin, bestatin, Antipain-hydrochloride, E-64-[N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate salt, Pepstatin A; Sigma Chemical Co.) and phosphatase (Cantharidin, (-)-p-Bromolevamisole oxalate and Calyculin A; Sigma) inhibitors. A small aliquot of the cell lysate (25 µL) was separated for protein dosage, using

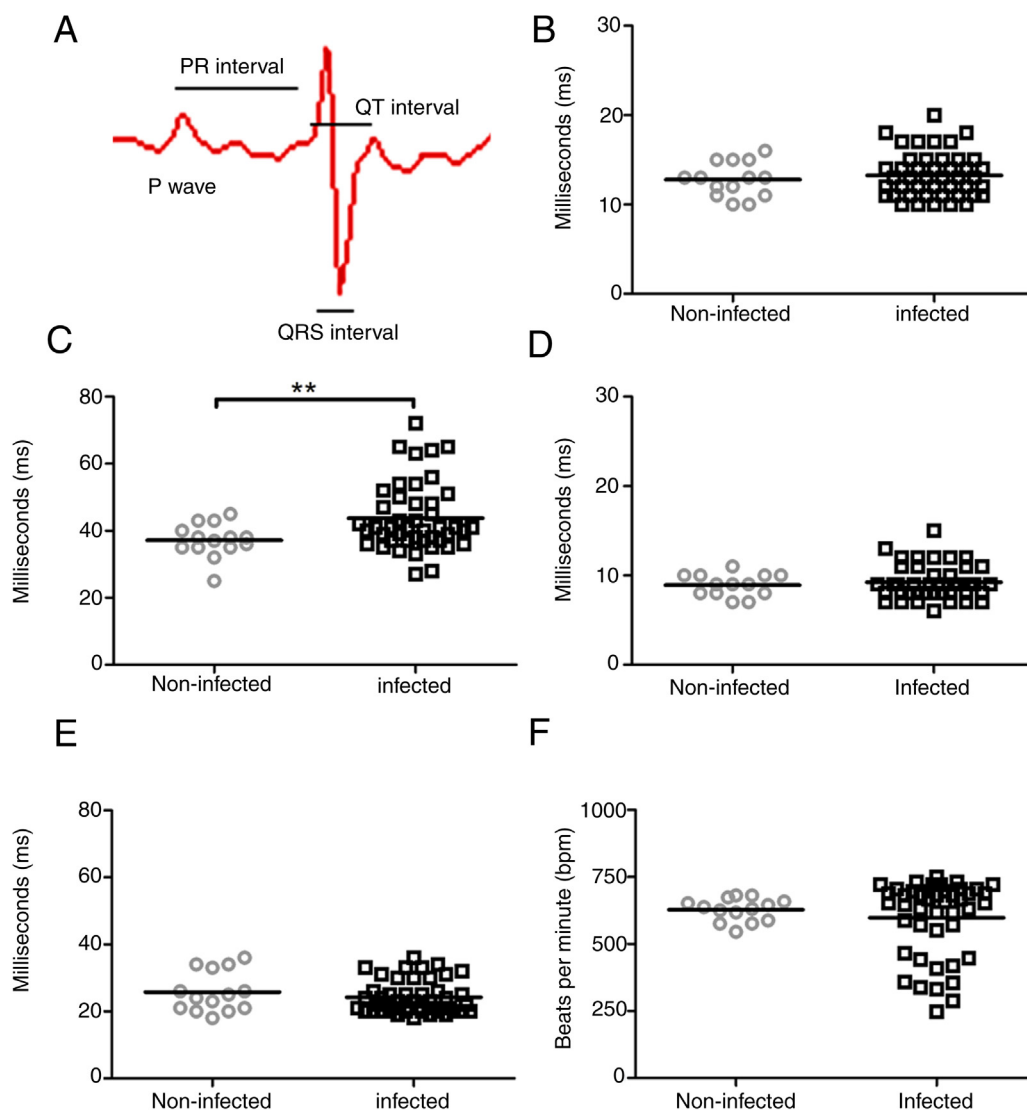


Fig. 1 – Evaluation of cardiac electrical conduction system in uninfected and Brazil strain *T. cruzi*-infected C57BL/6 mice. (A) Scheme of cardiac electrical impulses showing the atrial conduction (P wave), the transition between atrium and ventricle (PR interval), ventricular depolarization (QRS interval) and cardiac repolarization (QT interval). ECG analysis of uninfected (circle) and *T. cruzi*-infected mice (squares) demonstrated no significant difference in P wave (B), QRS (D) and QTc (E) intervals during the course of infection. However, a significant increase in the PR interval (C) and a slight decrease in heart rate (F) were evidenced in infected animals. Statistical significance relative to $p \leq 0.01$ between infected and uninfected mice.

the Follin–Lowry method, and the loading buffer (62.5 mM Tris–HCl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 0.01% bromophenol blue; and 5% β -mercaptoethanol) added to the rest of the protein extract followed by heating for 5 min at 100 °C. A total of 20–40 μ g of protein was resolved by SDS–PAGE (10%) according to the antigen analyzed. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes (BioRad, Hercules, CA) in transfer buffer (25 mM Tris–HCl 192mM glycine and 10% methanol, pH 8.3). Membranes were blocked for 40 min with 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS; 50mM Tris–Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl) containing 0.05% Tween 20 (TBST) prior to an overnight incubation (4 °C) with specific antibodies (anti-FAK and anti-ERK 1/2 antibodies (1:1000) and anti-fibronectin antibody, 1:2500), except for phosphorylated proteins whose antibodies

(anti-FAK-Y397, anti-FAK-S910 or anti-pERK1/2; 1:1000) were incubated in TBST containing 1% BSA. Then, the membranes were incubated for 1 h with the appropriated horseradish peroxidase-conjugated second antibody (1:20,000). The antigen-antibody complex was detected by chemiluminescence kit reagents (PIERCE; Thermo Scientific, Rockford, IL) and the membranes were exposed to Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare). All assays were normalized by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression, used as the internal control. Densitometric analysis was performed using ImageJ quantification software to measure the relative band intensity.

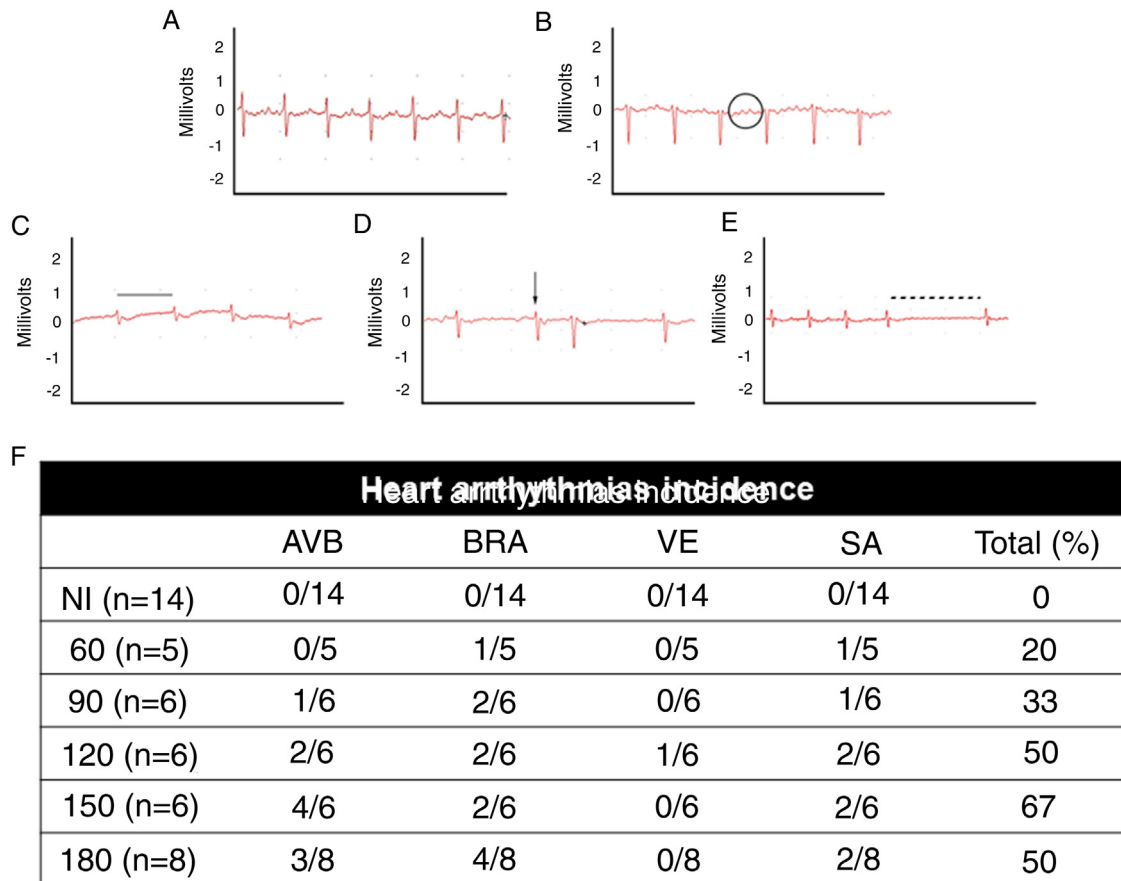


Fig. 2 – Electrocardiographic analysis of C57BL/6 mice infected with *T. cruzi* Brazil strain. Heart arrhythmias typification by ECG traces: (A) uninfected animals (NI); (B) *T. cruzi*-infected mice with atrioventricular block (AVB; black circle), (C) sinus bradycardia (BRA; black line), (D) ventricular extrasystole (VE; arrow) and (E) sinus arrhythmia (SA; traced line). Quantitative analysis of arrhythmia incidence in uninfected and *T. cruzi*-infected mice (F). A marked increase in cardiac arrhythmias was noticed during the course of *T. cruzi* chronic infection.

RNA extraction and reverse transcription

The hypertrophic marker atrial natriuretic peptide (ANP) gene expression was evaluated on heart fragments using a combination of TRIzol[®] (Invitrogen, California, USA) and RNeasy[®] mini kit (Qiagen, Austin, Texas, USA) for RNA extraction. Cardiac fragments (10 mg) were incubated with TRIzol[®] (Invitrogen) and stored at liquid nitrogen until use. Afterward, the cardiac tissue was homogenized with the Ultra-Turrax tissue Dispenser (IKA, Wilmington, USA) for 30 s. After 200 μ l chloroform addition and vigorous homogenizing, RNA was extracted from aqueous phase using a RNeasy kit, according to the manufacturer's recommendations. The amount of total RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm and purity at 260/280 and 260/230 nm ratios, using a Spectrophotometer Pico 200 (Picodrop Ltd., Saffron Walden, United Kingdom). Then, RNA (2 μ g) was reverse transcribed using the SuperScript III cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The cDNA concentration was measured using Qubit[®] ssDNA Assay Kit (Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) and adjusted to 10 ng/ μ L final concentration.

Real-time quantitative PCR

ANP gene expression was compared between noninfected and *T. cruzi*-infected cardiac tissues using Power SYBR[®] Green Master Mix (Life Technologies, CA, USA) RT-qPCR system. Forward and reverse primer sequences are shown in Table 1. PCR cycling conditions were: the first step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The relative quantification of amplified products was calculated by the comparative Ct method ($\Delta\Delta$ Ct) using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) as endogenous controls.³⁴ The amplifications were carried out in an ABI Prism 7500 Fast device (Applied Biosystems, USA). Gene expression was expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta$ Ct), compared to samples from uninfected mice used as calibrators. For the selection of reference gene candidates and gene expression analysis, the Expression Suite Software v1.1 (Life Technologies) was used.

Statistical analysis

Statistical analysis and graphics were performed using R (version 3.6.0) and R Studio. Statistical difference was considered if p -value ≤ 0.05 using t -test. All RT-qPCR assays were performed with biological triplicates in two independent experiments. Results were expressed as the means \pm standard deviations. Statistical tests from the ΔC_t values (student t -test or Mann-Whitney rank-sum test) were performed with GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

In an attempt to unravel the role of the FAK signaling pathway in *T. cruzi* cardiomyopathy, C57BL/6 mice were infected with *T. cruzi* Brazil strain and FAK signaling and its downstream effector (ERK1/2), acting on cardiac hypertrophy program, were analyzed on an acute and chronic infection. The peak of parasitemia (7×10^4 parasites/mL) was observed at 26 days post-infection (dpi) and then declined to an undetectable level after 45 dpi (data not shown). All mice survived the acute infection (30–60 dpi) and progressed to chronic infection, showing alterations in the cardiac electric conduction system observed by ECG parameters. The main electrocardiographic change was the slowing of atrioventricular (AV) nodal conduction, resulting in a prolonged PR interval (Fig. 1). A significant increase in the duration of the PR interval ($p \leq 0.05$) was observed in *T. cruzi*-infected mice (43.7 ± 10.2 ms) compared to uninfected groups (37.1 ± 5.0 ms), reflecting a delay in electrical conduction through AV node in chronically infected C57BL/6 mice. Another striking change was the incidence of atrioventricular blocks (AVB) in 67% of the infected mice at 150 dpi (Fig. 2). A trend towards a decrease in heart rate, or sinus bradycardia (BRA), was also observed between the groups of uninfected animals (627 ± 42 bpm) and those infected with *T. cruzi* (598 ± 140 bpm), with 50% of infected animals at 180 dpi (Fig. 2). The other parameters evaluated (P wave, QRS and QT intervals) showed no significant difference in chronically infected mice, remaining similar to uninfected animals (Fig. 1).

When assessing the kinetics of infection, we found a low incidence of cardiac arrhythmias (20%) at the acute infection (60 dpi) with a prevalence of BRA and sinus arrhythmia (SA) among infected animal groups. Progressively, the presence of cardiac arrhythmias became more prevalent in the electrocardiographic traces, ranging from 50 to 67% from 120 dpi with BRA, AVB and supraventricular extrasystole (VE) as relevant events in chronic infection (Fig. 2).

In view of the fact that our electrocardiographic findings were indicative of heart failure, revealed by the impairment of the cardiac electrical conduction system during the chronic phase of the infection causing severe arrhythmias, such as a decrease in heart rate, sinus bradycardia and promoting cardiovascular shock, we conducted our analysis for the detection of endothelin-1 (ET-1), a hypertrophic agonist capable of activating the FAK signaling pathway. Then, we assessed the plasmatic level of ET-1 during the course of *T. cruzi* infection by ELISA. Elevated plasma levels of ET-1 were detected in both acute and chronic *T. cruzi* infections (Fig. 3). Infection times

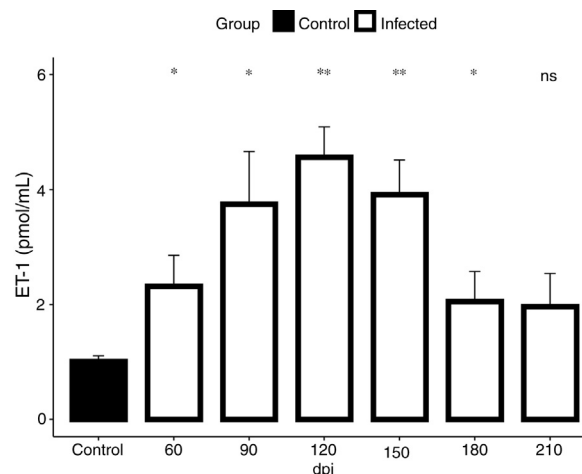


Fig. 3 – ET-1 plasma level in Brazil strain *T. cruzi*-infected C57BL/6 mice. Elevated ET-1 level was observed in the acute (60 dpi) and chronic (90–210 dpi) phases of *T. cruzi* infection. A 3.4-fold increase of ET-1 level (4.5 pmol/mL) was detected at 120 dpi compared to the uninfected animals (1.3 pmol/mL). ET-1 levels were expressed as mean (\pm SD) pM in the plasma of infected and uninfected C57BL/6 mice. Student's t -test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

from 60 to 180 dpi showed a significant increase in ET-1 plasma level compared to the baseline level of the uninfected group (1.3 pmol/mL). Plasma levels of ET-1 increased 3.4-fold and peaked at 120 dpi, reaching a maximal value of 4.5 pmol/mL (Fig. 3).

We further assessed if the abnormalities in cardiac hemodynamics and the increase of plasma ET-1 level induced activation of the FAK signaling pathway, since this protein tyrosine kinase (PTK) has been highlighted in response to changes in mechanotransduction mediated by cell stretching and cardiac overload. Our findings demonstrated the activation of FAK signaling in cardiac tissue of *T. cruzi*-infected mice, evaluated by phosphorylation of both tyrosine 397 (Y397) and serine 910 (S910) residues (Fig. 4). Although total FAK level was unaltered in *T. cruzi*-infected heart, FAK autophosphorylation at tyrosine residue 397 (Y397) was significantly increased after 90 dpi (0.9 ± 0.2), showing an activation peak at 120 dpi (1.04 ± 0.3) with 3.4-fold increased phosphorylated levels of FAK-Y397 (Fig. 4). A similar FAK activation curve was observed for phosphorylated FAK-S910 expression. However, high levels of FAK-S910 were noticed at 120 (1.0 ± 0.1) and 180 (1.12 ± 0.2) dpi, increasing 3.3 to 3.6-fold, respectively, compared to standard activation levels of uninfected animals (0.3 ± 0.08) (Fig. 4). Interestingly, FAK activation correlates with the ET-1 plasma level elevation and the enhancement of bradycardia (50%) in infected mice. Thus, since ERK1/2, a member of mitogen-activated protein kinases (MAP kinase) signaling pathway, has been implicated in the hypertrophic response modulated by FAK, the expression of total and phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) were also analyzed. Total ERK1 expression was practically invariable, except for the decline at 210 dpi, while its level of phosphorylation increased throughout the course of the infection (60–210 dpi) (Fig. 4). An interesting fact is that

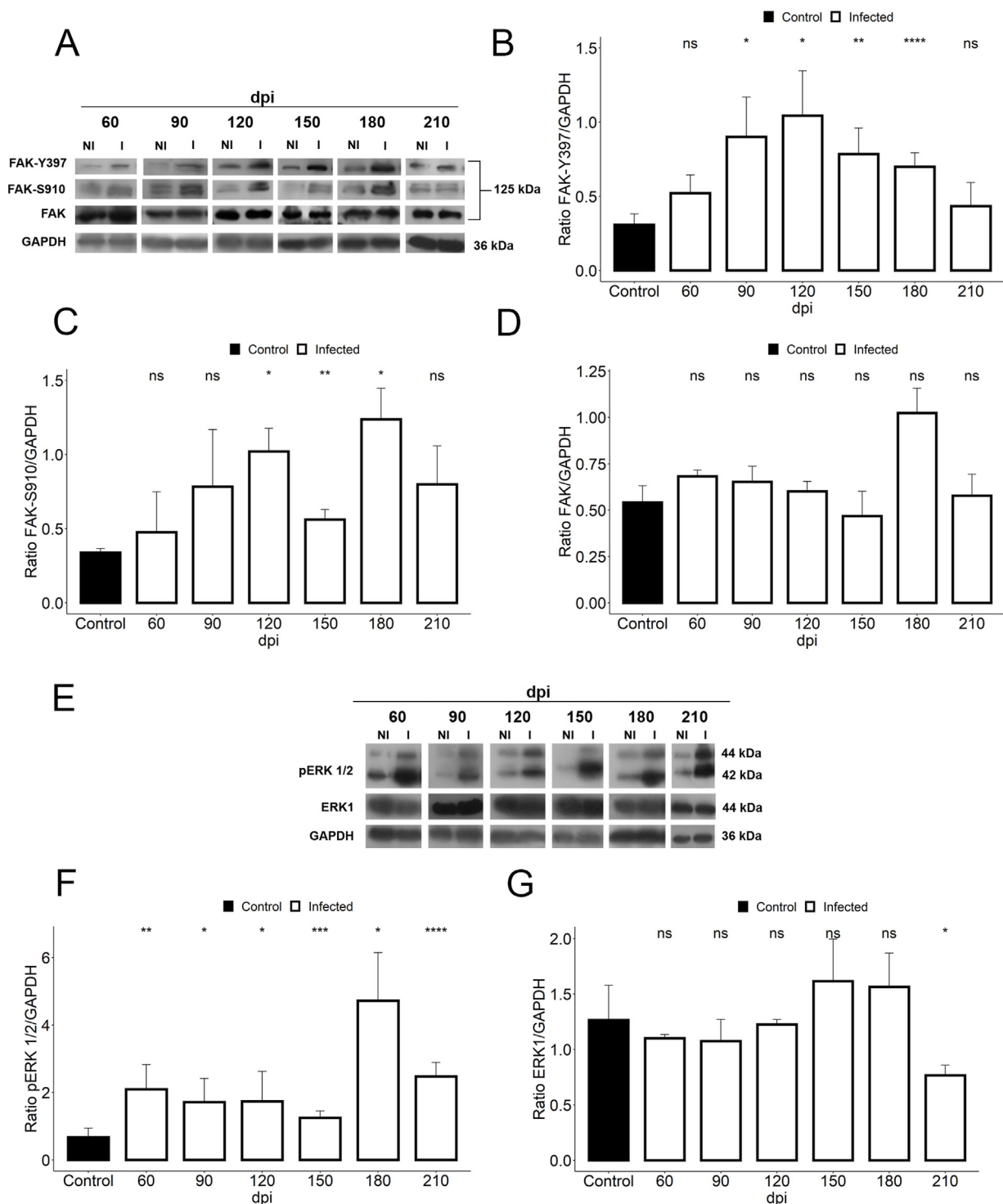


Fig. 4 – Activation of FAK signaling in *T. cruzi* chronic infection. (A) Representative immunoblot images of FAK, FAK-Y397 and FAK-S910. (B) An increase in FAK autophosphorylation (FAK-Y397) in the cardiac tissue occurred at the early chronic infection (90 dpi) and peaked at 120 dpi. (C) High levels of phosphorylated FAK-S910 was noticed from 120 to 180 dpi without alteration in total FAK expression (D). (E) Representative immunoblot images of ERK1 and phospho-ERK1/2 (pERK1/2). (F) pERK1/2 expression increased during the course of *T. cruzi* infection (60–210 dpi), peaking at 180 dpi. However, no change in ERK1 expression was observed in the cardiac tissue of infected animals, except the decline in ERK1 level at 210 dpi (G). GAPDH was used as an internal loading control. Student's t-test: ns - not significant, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.**

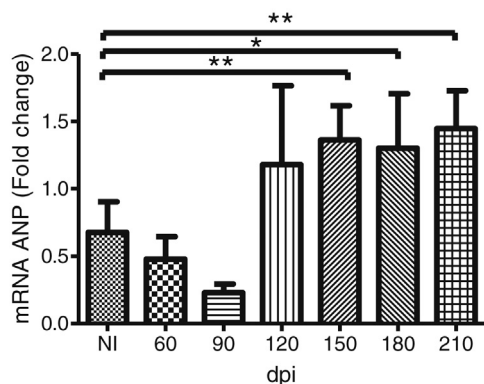


Fig. 5 – *Trypanosoma cruzi* chronic infection induces hypertrophic gene expression. Increased ANP mRNA expression, evaluated by RT-qPCR, was observed in the myocardium of C57BL/6 mice chronically infected with *T. cruzi* (150–210 dpi). HPRT and GAPDH genes were used as endogenous controls. The mean Ct values between control and infected groups were evaluated using Student's t-test or non-parametric Mann-Whitney rank sum test. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

the activation of ERK1/2 occurred prior to the activation of FAK, but coincided with the ET-1 plasma level increases. Phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) level peaked at 180 dpi (4.7 ± 0.7), coinciding with the FAK-S910 peak (Fig. 4).

To address whether the cardiac hypertrophy program was triggered in response to the activation of the FAK (Y397 and S910 residues)—ERK1/2 signaling cascade, we investigated the atrial natriuretic peptides (ANP) mRNA expression, a hypertrophic marker, by RT-qPCR. Marked upregulation of ANP mRNA expression was revealed in the myocardium of infected mice. Our results demonstrated that the ANP mRNA level tended to increase at 120 dpi, but a significant 2-fold increase in the expression of this hypertrophic marker was noticed in the Brazil strain infected mice from 150 dpi onwards (Fig. 5).

Additionally, the remodeling of the cardiac extracellular matrix (ECM) has been shown to be associated with myocardial hypertrophy and heart failure.³⁵ Thus, the myocardial fibrosis profile was also analyzed in the myocardium of *T. cruzi*-infected C57BL/6 mice. The spatial distribution and ECM components expression, as type 1 collagen (COL1) and fibronectin (FN), were assessed in the cardiac tissue. A thin deposition of COL1 (Fig. 6) and FN (Fig. 7) was observed in the myocardial interstitium of uninfected animals. A slight increase in COL1 deposition, as revealed by fluorescence images, was observed in the infected tissue at 60 and 90 dpi, becoming a dense fibrillar COL1 fluorescence signal at a later time of infection (120–210 dpi) (Fig. 6). The quantitative analysis, using Knime bioimage tools, also confirmed the augment in the COL1 expression in the myocardium of the infected mice (Fig. 6). Likewise, FN spatial distribution analysis also revealed an intense fluorescent signal, mainly after 60 dpi, with a dense FN deposition in the infected cardiac tissue (Fig. 7). Infected animals also showed enhancement in FN level, demonstrated by immunoblotting assay, showing a significant increase in

FN expression from 60 dpi compared to cardiac tissue from uninfected mice (Fig. 7).

Discussion

A plethora of signaling pathways have been implicated in the pathophysiology of cardiac hypertrophy. Thus, delineating the cellular and molecular mechanisms underlining the chagasic cardiac hypertrophy sheds light on Chagas disease pathogenesis. In this study, we addressed the role of FAK signaling in *T. cruzi* induced cardiac hypertrophy and heart failure.

FAK signaling emerged as a key cardiac hypertrophic regulator in response to biomechanical stress and humoral stimuli.³⁶ Our data suggest that both mechanical and hypertrophic agonist stimuli are involved in *T. cruzi* cardiac hypertrophic response. Integrin, a transmembrane receptor involved in force transmission, connects the contractile muscle apparatus to extracellular matrix components (ECM), regulating the mechanical force. FAK, a key molecule in mechanosignalling, interacts with integrin through structural proteins, as talin and vinculin, in focal adhesion sites and costameres.³⁷ Pressure overload induces FAK tyrosine phosphorylation and promotes c-Src activation in addition to downstream effectors of FAK, as ERK1/2 and AKT via GRB2 and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K).^{21,26,38,39} Our findings demonstrated that changes in integrin-mediated mechanical force, induced by fibrosis leading to pressure overload, activates FAK signaling and its downstream effector involved in hypertrophic response. The abnormal ECM deposition, revealed by enhancement of COL-1 and FN expression in cardiac tissue, causes its stiffness and disturbs mechanical homeostasis, altering integrin-mediated mechanotransduction. Additionally, disruption of vinculin costameres in *T. cruzi* infected myocardium may also contribute to alterations in the transmission of cardiac contraction force.⁴⁰ In this scenario, elevated FAK-Y397 phosphorylation level coincides with the ECG abnormalities, showing reduced heart rate, prolonged PR interval and increased rate of arrhythmias (from 90 dpi) suggestive of cardiac hypertrophy and heart failure. Interestingly, an *in vitro* model of acute infection by *T. cruzi* with high parasitic load revealed loss of spatial organization and downregulation of mechanosensitive proteins in cardiomyocytes, such as talin and paxilin, inducing a downregulation of the FAK signaling pathway activation and therefore, suggesting a disruption of integrin-dependent signaling transduction.⁴¹ FAK signaling activation has also been shown to be a beneficial event in ischemia/reperfusion, promoting cardiomyocytes survival under stress conditions. Activation of the NF- κ B survival signaling pathway, as downstream of FAK activation, modulates FAK-dependent cardioprotection by reducing proapoptotic genes level.⁴²

In addition to integrin-regulated FAK activation, this tyrosine kinase is also activated by ET-1, the hypertrophic agonist. ET-1, a potent vasoconstrictor involved in Chagas disease pathogenesis, has been reported to trigger FAK activation and promotes cardiac hypertrophic remodeling.⁴³ As expected, Brazil strain C57BL/6 mice infection induced ET-1 plasma level increase and cardiac dysfunction in both acute and chronic infection. High ET-1 plasma level has been reported

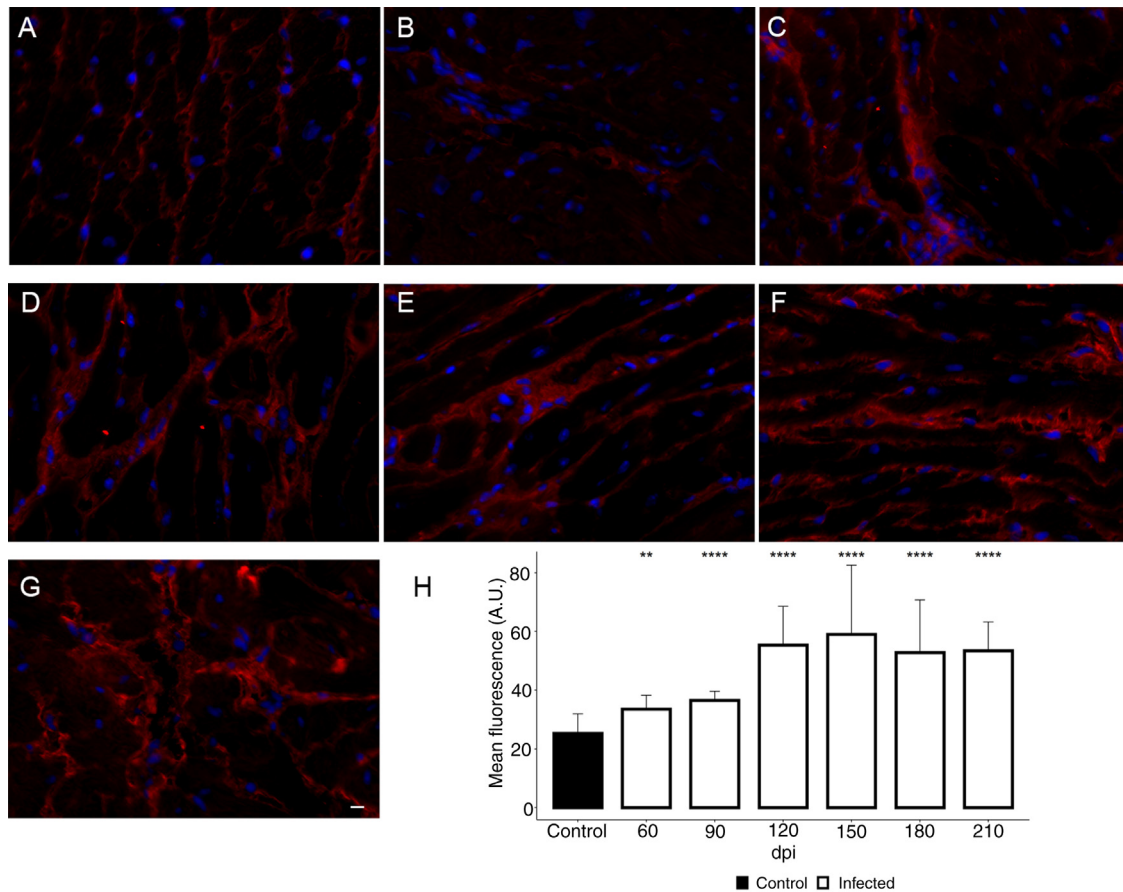


Fig. 6 – Enhancement of type 1 collagen (COL1) expression in the myocardium of *T. cruzi*-infected mice. (A) Distribution of COL1 (red) in the cardiac tissue of uninfected mice. A gradual increase in COL1 deposition was noticed in the myocardium at later acute (60 dpi; B) and early chronic infection (90 dpi; C). Dense COL1 fibrils were clearly seen at 120 (D), 150 (E), 180 (F) and 210 dpi (G). The increase in COL1 expression was confirmed by measuring the COL1 fluorescence signal with Knime workflow (H). DAPI (blue) stained nucleus. Bar = 10 μ m. Student's t-test: **p \leq 0.01; *p \leq 0.001; ****p \leq 0.0001.**

in patients with Chagas cardiomyopathy⁴⁴ and also in a mouse model of *T. cruzi* chronic infection (Brazil strain), which evolved to right ventricular enlargement.^{15,19} In our findings, elevated ET-1 levels were associated with ERK1/2 phosphorylation up-regulation, still in the acute phase of infection (60 dpi). Also, increased ERK1/2 activation preceded FAK-S910 phosphorylation (120 dpi), suggesting that FAK undergoes FAK-S910 phosphorylation via ERK1/2 signaling as previously reported for dilated cardiomyopathy (DCM).²⁰ ET-1 stimulated neonatal rat ventricular myocyte (NRVM) cultures, in an ET_AR-dependent protein kinase C delta (PKC δ) activation, induced ERK1/2 activation through Raf-1—MEK1/2 effectors, resulting in FAK-S910 phosphorylation and sarcomere assembly during cardiac myocyte hypertrophy.²⁰ Also, bi-directional crosstalk between Src and PKC δ has been proposed with ET-1 stimulating PKC δ -MEK1-ERK1/2 and Src-MEK1-ERK1/2 pathways^{20,45} or Src-MEK5-ERK5.²⁰ Sustained MEK1-ERK1/2 activation has been shown to promote cardiac hypertrophy and anti-apoptotic effect.⁴⁶ Additionally, ET-1 has also been highlighted in *T. cruzi* infection due to its role in triggering the Ca²⁺/calineurin (Cn)/nuclear factor of activated T cells (NAFT) signaling pathway, causing the activation of fetal gene program.¹⁶ C57BL/6 and Balbc mice infected with

T. cruzi Y strain showed high levels of ET-1 and eicosanoids (cyclooxygenase-2; COX2) associated with high tissue parasitism and myocarditis. The cooperative action between ET-1 and *T. cruzi* infection regulates the increase in COX2 expression by activating the Cn/NAFTc4 signaling pathway in HL-1 atrial myocytes, leading to ANP production.¹⁶ Curiously, our results demonstrated a significant increase in ANP mRNA expression only from 150 dpi, but with a tendency to increase by 120 dpi. Although hypertrophy has been well established in Brazil strain infected C57BL/6 mice, this experimental model of *T. cruzi* infection gradually develops dilated cardiomyopathy with an increase in right ventricular internal diameter after 100 dpi.¹⁵ In contrast, a study analyzing the electrocardiographic profile of different mice lineage and *T. cruzi* strains, as a model for experimental chagasic cardiomyopathy, did not show significant changes in the ECG of B6 mice infected with Brazil strain, probably due to the short period of infection analyzed (up to 13 weeks).⁴⁷

Activation of hypertrophic response program in response to *T. cruzi* infection has been shown to depend on Toll-like receptor 2 and NF- κ B activation, leading to an increase in the

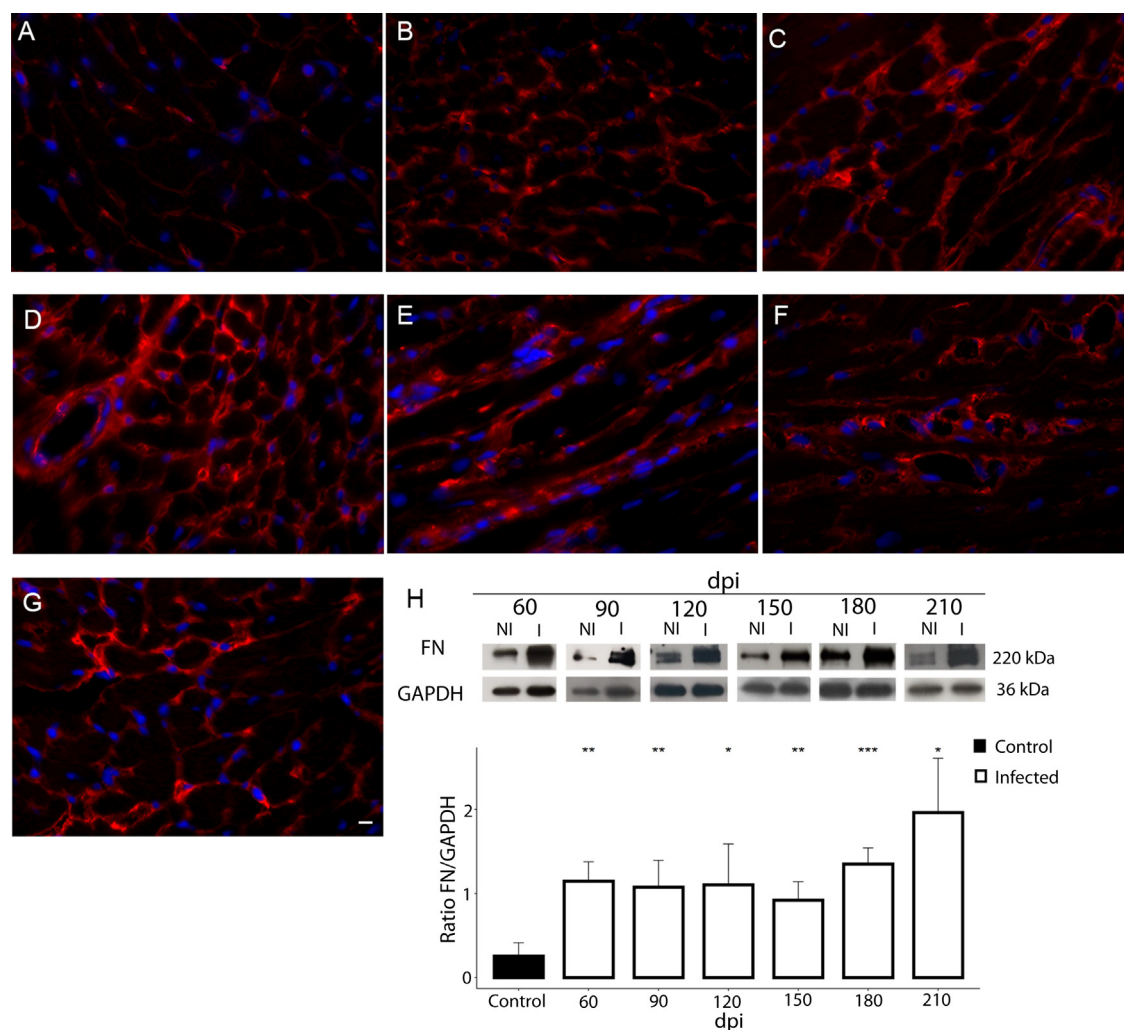


Fig. 7 – Fibronectin (FN) expression in chronically infected C57BL/6 mice. (A) FN spatial distribution in the myocardium of uninfected mice. (B–G) Thick deposition of FN was observed in the cardiac tissue of *T. cruzi*-infected mice. Intense fluorescence signal in the myocardium interstitium was observed at 60 (B), 90 (C), 120 (D), 150 (E), 180 (F) and 210 dpi (G). Representative immunoblotting image and densitometric analysis showing a significant increase of FN expression in acute (60 dpi) and chronic infection (90–210 dpi) (H). DAPI (blue) stained the nucleus. Bar = 10 μ m. GAPDH was used as an internal control for protein normalization. Student's t-test: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.001$.**

IL-1 β level and cardiomyocyte hypertrophy (Petersen et al., 2005).¹¹ On the other hand, PI3K-AKT/nitric oxide (NO) signaling has been demonstrated to be implicated in the cardiac myocyte remodeling of chagasic cardiomyopathy.¹² C57BL/6 mice infected with Colombian strain induced PI3K-AKT/NO signaling pathway activation with cardiac hypertrophy evidenced in the acute (30 dpi) and the early chronic phase (90 dpi) of *T. cruzi* infection, showing increased mRNA level of hypertrophic markers.¹² A remarkable feature is that ERK1/2 and AKT have been highlighted as a downstream effector of FAK activation^{37,48} and FAK signaling may also regulate NF- κ B activation,⁴⁹ suggesting that chagasic cardiac hypertrophy may be regulated by complex regulatory interactions involving interlaced networks of multiple signaling pathways.

Conclusion

Our data contribute with new insights on the regulation of cardiac hypertrophy induced by *T. cruzi* infection. We demonstrated that the FAK signaling pathway regulates the hypertrophic process in chronic chagasic cardiomyopathy. Cardiac overload induced by ET-1-mediated extracellular matrix remodeling and tissue damage triggers the hypertrophic response via ET-1-ERK1/2-FAKS910 and integrin-FAKY397-ERK1/2, leading to activation of the fetal gene program, heart failure and hypertrophy. Further studies will be carried out to evaluate the effect of FAK signaling inhibitors in the therapy of Chagas disease.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Oswaldo Cruz Institute of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (Papes VI)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (grant 421856/2017-3 and 424015/2018-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (grant E-26/010.101050/2018) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors thank Alanderson da Rocha Nogueira for technical support and the Platform of Real Time PCR RPT09A from Fiocruz, by the use of the equipment and support.

REFERENCES

- Bonney KM. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*. 2014;21:11–21.
- World health Organization 2020. <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>. Assessed on 03-06-2020.
- Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, et al. Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Front Public Health*. 2019;7:166–79.
- Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverría LE, et al. Chagas cardiomyopathy: an update of current clinical knowledge and management: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2018;138:e169–209.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JÁ. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375:1388–402.
- World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates = Maladie de Chagas en Amérique latine: le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010. *Weekly Epidemiol Record Relevé Épidémiol Hebdomad*. 2015;90:33–44.
- Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96:434–42.
- Di Toro D, Baranchuk A. Sudden cardiac death in chagas disease. *Int Cardiovasc Forum J*. 2016;7. ISSN 24093424. Available at: <http://icfjournal.org/index.php/icf/article/view/302>. Date accessed: 10 mar. 2020.
- Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15:387–407.
- Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun*. 2003;71:4441–7.
- Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1beta-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2005;73:6974–80.
- Roman-Campos D, Sales-Junior P, Duarte HL, Gomes ER, Lara A, Campos P, et al. Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: role of PI3Kinase/NO axis. *Int J Cardiol*. 2013;167:3011–20.
- Hassan GS, Mukherjee S, Nagajyothi F, Weiss LM, Petkova SB, de Almeida CJ, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells. *Infect Immun*. 2006;74:152–9.
- Mukherjee S, Huang H, Petkova SB, Albanese C, Pestell RG, Braunstein VL, et al. *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Infect Immun*. 2004;72:5274–82.
- Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loredó ML, Weiss LM, et al. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun*. 2005;73:2496–503.
- Corral RS, Guerrero NA, Cuervo H, Gironès N, Fresno M. *Trypanosoma cruzi* infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2034–45.
- Freeman BD, Machado FS, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases. *Life Sci*. 2014;118:110–9.
- Petkova SB, Tanowitz HB, Magazine HI, Factor SM, Chan J, Pestell RG, et al. Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cardiovasc Pathol*. 2000;9:257–65.
- Petkova SB, Huang H, Factor SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, et al. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol*. 2001;31:499–511.
- Chu M, Iyengar R, Koshman YE, Kim T, Russell B, Martin JL, et al. Serine-910 phosphorylation of focal adhesion kinase is critical for sarcomere reorganization in cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2011;92:409–19.
- Franchini KG. Focal adhesion kinase—the basis of local hypertrophic signaling domains. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:485–92.
- Mohanty P, Bhatnagar S. Structure of focal adhesion kinase in healthy heart versus pathological cardiac hypertrophy: a modeling and simulation study. *J Mol Graph Model*. 2018;80:15–24.
- Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:677–95.
- Wilcox-Adelman SA, Denhez F, Goetinck PF. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem*. 2002;277:32970–7.
- Salazar EP, Rozengurt E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem*. 2001;276:17788–95.
- Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2006;70:422–33.
- Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;45:24–30.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*. 1994;14:1680–8.
- Samarel AM. Focal adhesion signaling in heart failure. *Pflugers Arch*. 2014;466:1101–11.
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 1962;4:389–96.
- Araújo-Jorge TC, De Castro SL. Questões da doença humana para trabalho em modelos animais. In: Araújo-Jorge TC, de Castro SL, editors. *Doença de Chagas: manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2000. p. 17–9.

32. Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am J Physiol.* 1998;274:H747–51.
33. Dietz C, Berthold MR. KNIME for open-source bioimage analysis: a tutorial. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2016;219:179–97.
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods.* 2001;25:402–8.
35. Hutchinson KR, Stewart JA Jr, Lucchesi PA. Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:564–9.
36. Cardoso AC, Macedo Pereira AH, Berteli Ambrosio AL, Consonni SR, Rocha de Oliveira R, Bajgelman MC, et al. FAK forms a complex with MEF2 to couple biomechanical signaling to transcription in cardiomyocytes. *Structure.* 2016;24:1301–10.
37. Graham ZA, Gallagher PM, Cardozo CP. Focal adhesion kinase and its role in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2015;36:305–15.
38. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, Saad MJ. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res.* 2000;87:558–65.
39. Franchini KG, Clemente CF, Marin TM. Focal adhesion kinase signaling in cardiac hypertrophy and failure. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42:44–52.
40. Melo TG, Almeida DS, de Meirelles Mde N, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* infection disrupts vinculin costameres in cardiomyocytes. *Eur J Cell Biol.* 2004;83:531–40.
41. Melo TG, Adesse D, Meirelles MN, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi* down-regulates mechanosensitive proteins in cardiomyocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114:e180593.
42. Hakim ZS, DiMichele LA, Rojas M, Meredith D, Mack CP, Taylor JM. FAK regulates cardiomyocyte survival following ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:241–8.
43. Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, Samarel AM. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1695–707.
44. Salomone OA, Caeiro TF, Madoery RJ, Amuchástegui M, Omelinauk M, Juri D, et al. High plasma immunoreactive endothelin levels in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2001;87:1217–20.
45. Chu M, Iyengar R, Koshman Y, Kim T, Samarel AM. Endothelin-1 induces Serine 910 phosphorylation of focal adhesion kinase via PKCdelta-and Src-dependent signaling pathways. *FASEB J.* 2010;24.
46. Mutlak M, Kehat I. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. *Front Pharmacol.* 2015;6:149–57.
47. Eickhoff CS, Lawrence CT, Sagartz JE, Bryant LA, Labovitz AJ, Gala SS, et al. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *J Parasitol.* 2010;96:758–64.
48. Wei H, Vander Heide RS. Heat stress activates AKT via focal adhesion kinase-mediated pathway in neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H561–8.
49. Crosara-Alberto DP, Inoue RY, Costa CR. FAK signalling mediates NF-kappaB activation by mechanical stress in cardiac myocytes. *Clin Chim Acta.* 2009;403:81–6.
50. Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, et al. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* concentrations. *Infect Immun.* 2014;82:5203–13.
51. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, de Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2015;9:e0003849.