



**BAHIANA**  
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

LEONARDO DANTAS GESTEIRA

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA VIA  $S_1P/S_1PR_2$  NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA  
CRÔNICA EXPERIMENTAL**

SALVADOR – BA

2021

LEONARDO DANTAS GESTEIRA

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA VIA S<sub>1</sub>P/S<sub>1</sub>PR<sub>2</sub> NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA  
CRÔNICA EXPERIMENTAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina da Faculdade Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para aprovação no quarto ano do curso.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Fraga Vasconcelos

SALVADOR – BA

2021

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCC – Cardiopatia Chagásica Crônica  
CCL2- Ligante 2 de quimiocina CC  
CCL3- Ligante 3 de quimiocina CC  
CCL4- Ligante 4 de quimiocina CC  
CCL5- Ligante 5 de quimiocina CC  
CCR5- Receptor CCR5  
cDNA- Ácido desoxirribonucleio complementar  
CER- Ceramida  
CHI313 – Quitinase 3  
COL-1- Colageno tipo 1  
CTGF- Fator de crescimento de tecido conjuntivo  
CXCL10 – Quimiocina CXCL10  
CXCR3- Receptor CXCR3  
DMS- Dimetilestifingosina  
EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético  
EMT – Processo de transição epitélio-mesenquimal  
FSP1- Proteína específica de fibroblastos  
IFN- $\gamma$ - Interferon-gama  
IL- Interleucina  
INOS – Óxido nítrico sintase  
JTE-013- Pyrazolopyridine analog  
NO- Óxido nítrico  
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase  
PFA – Paraformaldeído  
PIFG- Picrosirius-red  
RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro  
S<sub>1</sub>P – Esfingosina 1- fosfato

SPKH1- Enzima esfingosina-quinase-1

SPKH2- Enzima esfingosina-quinase-2

S<sub>1</sub>PR<sub>(1-5)</sub> - Receptor esfingosina-1-fosfato (1-5)

TGF-β – Fator de crescimento transformador beta

Th1- Células T auxiliares tipo 1

TNF-α- Fator de necrose tumoral

## RESUMO

**Introdução:** a doença de Chagas é uma enfermidade endêmica que assola mais de 15 milhões de pessoas ao redor do mundo, principalmente na América latina. A forma cardíaca crônica da doença causa repercussões no sistema elétrico do coração e hipertrofia cardíaca com contribuição do sistema imunológico provocado pelo parasita que se aloja no tecido miocárdico. **Objetivo:** Avaliar o bloqueio da via  $S_1P/S_1PR_2$  através do tratamento com JTE-013 na inflamação miocárdica em modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica. **Metodologia:** Camundongos C57BL/6 foram infectados através da inoculação de  $10^2$  tripomastigotas *T. cruzi* da cepa Colombiana. Seis meses após a infecção, os animais foram divididos em dois grupos: Tratados com JTE-013 ou tratados com salina. Animais não infectados foram utilizados como controle. Após eutanásia foi coletado sangue e coração dos animais dos grupos experimentais. Lâminas do coração dos animais foram coradas por HE para quantificação da inflamação. O percentual de fibrose foi determinado integrando as áreas de tecido fibrótico e não-fibrótico em cada campo, em cortes de coração corados com Sirius Red. A análise da expressão gênica dos marcadores de inflamação TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , FOXP3 e CD45 foi realizada pela técnica de qRT-PCR. **Resultados:** Houve redução do infiltrado inflamatório na análise histológica do coração de camundongos infectados com o *T. cruzi* tratados com o fármaco JTE-013 em comparação com o grupo infectado não tratados ( $p < 0,01$ ). Na análise de percentual de fibrose, não se encontrou diferença significativa entre os camundongos infectados tratados com JTE-013 ou tratados com salina ( $p < 0,01$ ). A quantificação da expressão de citocinas mostrou redução de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , além também da redução de iNOS ( $p < 0,001$ ) nos camundongos infectados e tratados com JTE-013. A análise da expressão de CD45 mostrou redução nos camundongos infectados e tratados com JTE-013 ( $p < 0,001$ ). A expressão de COL-1 não mostrou redução significativa nos camundongos infectados e tratados com JTE-013 ( $p < 0,001$ ). A expressão de FOXP3 mostrou redução nos camundongos infectados e tratados com JTE-013. **Conclusão:** O tratamento com o fármaco JTE-013 reduziu inflamação no coração dos camundongos infectados tratados comparado com o controle não-tratado, porém não houve redução significativa do percentual de fibrose desses corações. A redução da inflamação pode representar um benefício significativo para o paciente com CCC no entanto novos estudos, com desenhos específicos, são necessários para que o JTE-013 possa ser utilizado no tratamento da CCC.

Palavras-chave: Cardiopatia Chagásica Crônica Experimental. Imunomodulação. Esfingosina-1-fosfato ( $S_1P$ ). JTE-013.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chagas disease is an endemic disease that plagues more than 15 million people around the world, mainly in Latin America. The chronic cardiac form of the disease causes repercussions in the electrical system of the heart and cardiac hypertrophy with the contribution of the immune system caused by the parasite that lodges in the myocardial tissue. **Objective:** To evaluate the blockade of the S1P / S1PR2 pathway through treatment with JTE-013 in myocardial inflammation in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy. **Methodology:** C57BL / 6 mice were infected through the inoculation of  $10^2$  *T. cruzi* trypomastigotes of the Colombian strain. Six months after infection, the animals were divided into two groups: Treated with JTE-013 or treated with saline. Uninfected animals were used as controls. After euthanasia, blood and hearts were collected from the animals in the experimental groups. The heart slides of the animals were stained with HE to quantify the inflammation. The percentage of fibrosis was determined by integrating the areas of fibrotic and non-fibrotic tissue in each field, in heart sections stained with Sirius Red. The analysis of gene expression of inflammation markers TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , FOXP3, and CD45 was performed using the qRT-PCR technique. **Results:** There was a reduction in the inflammatory infiltrate in the histological analysis of the heart of mice infected with *T. cruzi* treated with the drug JTE-013 compared to the untreated infected group ( $p < 0.01$ ). In the analysis of the percentage of fibrosis, no significant difference was found between infected mice treated with JTE-013 or treated with saline ( $p < 0.01$ ). Quantification of cytokine expression showed a reduction in IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , in addition to a reduction in iNOS ( $p < 0.001$ ) in mice infected and treated with JTE-013. Analysis of CD45 expression showed a reduction in mice infected and treated with JTE0-13 ( $p < 0.001$ ). COL-1 expression did not show a significant reduction in mice infected and treated with JTE-013 ( $p < 0.001$ ). FOXP3 expression showed a reduction in mice infected and treated with JTE0-13. **Conclusion:** Treatment with the drug JTE-013 reduced heart inflammation in treated infected mice compared to untreated control, but there was no significant reduction in the percentage of fibrosis in these hearts. The reduction of inflammation can represent a significant benefit for the patient with CCC. However, new studies are necessary with a specific trial design to JTE0-13 that can be used in the treatment of CCC.

Keywords: Experimental Chronic Chagas Heart Disease. Immunomodulation. Sphingosine-1-phosphate (S<sub>1</sub>P). JTE-013.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1.INTRODUÇÃO</b> .....  | 7  |
| <b>2.OBJETIVOS</b> .....   | 10 |
| 2.1 Objetivo geral.....  | 10 |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 10 |
| <b>3.JUSTIFICATIVA</b> .....   | 11 |
| <b>4.REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 12 |
| 4.1 A doença de Chagas.....  | 12 |
| 4.2 Inflamação e Fibrose.....  | 15 |
| 4.3 A esfingosina-1-fosfato e o receptor S <sub>1</sub> P <sub>2</sub> ..... | 17 |
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  | 21 |
| 5.1 Desenho experimental, local e período de estudo.....                     | 21 |
| 5.2 Animais e amostra.....   | 21 |
| 5.3 Infecção e parasitemia.....  | 21 |
| 5.4 Grupos experimentais e tratamento.....                                   | 21 |
| 5.5 Eutanásia e coleta de material.....                                      | 22 |
| 5.6 Coloração de lâminas.....  | 23 |
| 5.7 Quantificação da inflamação e fibrose cardíaca.....                      | 23 |
| 5.8 Análise da expressão gênica por PCR.....                                 | 23 |
| 5.9 Análise estatística.....   | 24 |
| <b>6. RESULTADO</b> .....  | 25 |
| <b>7. DISCUSSÃO</b> .....  | 29 |
| <b>8. CONCLUSÃO</b> .....  | 32 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 33 |

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença endêmica e negligenciada que engloba todos os países da América Latina e afeta milhões de pessoas<sup>1</sup>. O agente etiológico responsável pela doença é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado com ciclo de vida complexo<sup>2</sup>. O vetor que geralmente a transmite é o inseto triatomíneo da família *Reduviidae*, popularmente conhecido como barbeiro<sup>3</sup>. No Brasil, a dificuldade de acesso ao sistema público de saúde aliada à descoberta tardia da doença, leva à cronificação da enfermidade em cerca de um terço dos pacientes infectados, que passam a desenvolver uma forma cardíaca e fatal<sup>4</sup>.

A patogenia que gera a cardiopatia ainda é desconhecida, todavia, supõe-se que dois principais mecanismos sejam fundamentais. O primeiro, uma resposta imunológica mediada contra o parasita que se fixa ao cardiomiócito, isto é, o parasito é responsável direto pelo dano miocárdico. O segundo, auto reatividade desencadeada pela própria infecção, ou seja, o organismo humano é responsável por liberar citocinas e células de defesa que podem cursar com citotoxicidade para as células miocárdicas. Secundário a esses mecanismos, temos distúrbios neurogênicos e desarranjo das estruturas microvasculares coronarianas<sup>5,6</sup>. De uma forma geral, esses mecanismos são permeados pelos processos de inflamação e fibrose<sup>7</sup>. Tais processos, são precursores da insuficiência cardíaca, bradi e taquiarritmias, tromboembolismos, aneurisma ventricular, cardiomiopatia dilatada, que podem culminar na morte do paciente<sup>6</sup>.

As drogas de escolha no tratamento da fase crônica cardíaca para combate ao parasito são o nifurtimox e o benznidazol<sup>8</sup>. Apesar de estudos observacionais terem mostrado que ambos reduzem morbidade e mortalidade<sup>9-11</sup>, eles ainda são medicamentos que promovem intensos debates. Os mesmos possuem bastante efeitos adversos como parestesias (10,3%), artralgias (8,1%) e intolerância gastrointestinal (13,3%)<sup>12</sup>, os quais podem ocorrer em até 50% dos casos de adultos na fase crônica da doença<sup>13</sup>. Além disso, podem apresentar pouca eficácia na fase crônica da doença, como foi visto em adultos acima de 50 anos em que o tratamento com foco na cura não foi satisfatório<sup>9</sup>, tendo em vista que a soroconversão pode levar anos a décadas para se estabelecer perfil de cura.<sup>14-17</sup>. Ainda, em pacientes grávidas, essas drogas de escolha têm restrições muito relevantes quanto ao seu uso, pois elas podem gerar genotoxicidade, além dos efeitos adversos já citados e outros, como manifestações cutâneas (benznidazol) e gastrointestinais (nifurtimox)<sup>14,15,18</sup>.

Dessa forma, outra alternativa seria o transplante cardíaco em pacientes que sofrem de severa cardiomiopatia causada pela doença<sup>19</sup>, todavia, o transplante de coração requer o uso de imunossupressores a fim de se evitar rejeição do órgão transplantado<sup>20-23</sup>. Com a terapia imunossupressora, existe a possibilidade dos pacientes apresentarem reativação da doença, a qual pode trazer consequências devastadoras para o paciente, como miocardite, podendo resultar em rejeição do órgão transplantado e rápido episódio de falência cardíaca congestiva<sup>20,23-25</sup>.

Devido a carência de drogas que tratem a doença de Chagas na fase crônica, a comunidade científica tem mostrado bastante esforço para tentar elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da cardiomiopatia chagásica crônica, assim como ensaios clínicos continuam sendo realizados para desenvolver terapias que tragam melhores resultados para os pacientes nesta condição<sup>15</sup>. Em um desses ensaios clínicos, procurou-se drogas capazes de inibir o gene CPY51, responsável pela síntese de ergosterol, principal componente da membrana do *T. cruzi*, que faz parte tanto da membrana plasmática, mitocondrial interna, como também dos glicosossomos, este último característico do grupo dos *kinetoplastida* ao qual pertence o parasita<sup>26-28</sup>. Não obstante, testou-se novas substâncias que promovem a diminuição da síntese de ergosterol do *T. cruzi*, como o posaconazole<sup>29</sup> e fosravuconazole<sup>16</sup>, porém, esses estudos não obtiveram resultados satisfatórios<sup>15</sup>. Além dos ensaios clínicos no controle da síntese do ergosterol, foi realizado em ensaio clínico de fase I com células mononucleares da medula óssea em 28 pacientes com CCC, com melhora da fração de ejeção, sem, no entanto, apresentar alteração significativa nos marcadores de necrose miocárdica<sup>30</sup>.

Os camundongos C57BL/6 são úteis no trabalho com a CCC porque apresentam perfil de inflamação miocárdica, estabelecimento de parasitemia e resposta mediada por quimiocinas semelhantes ao humano. Por essa razão, essa espécie torna-se relevante no estudo de CCC por simular de maneira análoga a depleção cardíaca promovida pela resposta inflamatória<sup>31</sup>

Pensando-se no desenvolvimento de novo arsenal terapêutico, a esfingosina 1-fosfato (S<sub>1</sub>P) é uma importante molécula amplamente conhecida e responsável por diversas ações e efeitos no organismo, como proliferação, migração, contração e mobilização intracelular de cálcio. O S<sub>1</sub>P participa do grupo dos esfingolipídios e pode ligar-se a cinco receptores de membrana S<sub>1</sub>PR<sub>(1-5)</sub> que apresentam expressão diferenciada nos diversos tipos celulares. No

coração dos camundongos, assim como ocorre nos humanos, os cardiomiócitos expressam os receptores S<sub>1</sub>PR<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>PR<sub>2</sub> e S<sub>1</sub>PR<sub>3</sub>. Sabe-se que o S<sub>1</sub>P possui ação protetora no coração, mas ao mesmo tempo que essa ação pode se tornar benéfica, ela pode também ser deletéria, na medida em que o composto ativa vias de proliferação de fibroblastos envolvidos no processo de fibrose e remodelamento cardíaco<sup>32</sup>.

Sabe-se que os fibroblastos cardíacos são a chave para mediadores de inflamação e fibrose na injúria e falência cardíaca<sup>33</sup>. Associado a esses processos, diversos autores demonstraram que o S<sub>1</sub>P e os seus receptores estão envolvidos em muitas ações fisiológicas distintas, e em alguns estudos, identificou esses compostos como fator de desenvolvimento da fibrose pulmonar idiopática e da fibrose pulmonar em modelos animais, evidenciando, inclusive, aumento da S<sub>1</sub>P no lavado broncoalveolar de pacientes com fibrose pulmonar idiopática<sup>34</sup>. Entretanto, não se sabe se a ativação do receptor S<sub>1</sub>PR<sub>2</sub> pode ou não cursar com maior acometimento cardíaco no coração chagásico em fase crônica. Dessa forma, buscamos avaliar o tratamento com o *Pyrazolopyridine analog* (JTE0-13), um bloqueador do receptor S<sub>1</sub>PR<sub>2</sub>, a fim de bloquear seletivamente esse receptor<sup>35</sup>. Portanto, o presente estudo visa elucidar se o bloqueio seletivo do receptor S<sub>1</sub>PR<sub>2</sub> em modelo murino de cardiopatia chagásica crônica, repercute em redução da resposta inflamatória cardíaca.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o efeito da inibição da via  $S_1P/S_1PR_2$  através do tratamento com JTE0-13 na cardiopatia chagásica crônica em modelo experimental murino.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar número de células inflamatórias e de percentual de fibrose no coração de camundongos chagásicos crônicos;
- Analisar a expressão gênica de IFN- $\gamma$ , COL-1, TNF- $\alpha$ , CD45, FOXP3 e iNOS no coração dos animais tratados.

### 3. JUSTIFICATIVA

O presente estudo é relevante na medida em que busca alvos terapêuticos alternativos ao tratamento convencional que, para pacientes chagásicos em fase crônica sintomática, é ineficaz. A busca por medicamentos capazes de tratar indivíduos na fase crônica da doença que apresentam acentuados processos de inflamação e fibrose associados à injúria cardíaca é de grande importância. Como se sabe, o eixo S<sub>1</sub>P/ S<sub>1</sub>PR tem se mostrado como regulador importante de imunidade, participando do tráfico de células inflamatórias como macrófagos e monócitos e tendo, portanto, papel significativo nas doenças inflamatórias<sup>36,37</sup>. Tais mediadores de inflamação estão associadas à produção de citocinas e quimiocinas, responsáveis por modular o processo inflamatório, tais quais TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$  e IL-10. Em estudos de células envolvidas nesses processos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, o JTE0-13, antagonista do receptor S<sub>1</sub>PR<sub>2</sub> provou ser importante regulador da migração de macrófagos e monócitos derivados da medula<sup>38</sup>, os quais se caracterizam por serem células associadas aos processos de injúria hepática, inflamação, fibrose, remodelamento tecidual mediado por proteínas de matriz extracelular e regeneração<sup>39-42</sup>. Portanto, o JTE0-13 evidenciou redução do recrutamento dessas células para o local da inflamação e, por consequência, diminuição da produção de citocinas inflamatórias, envolvidas nos processos de fibrogênese e inflamação<sup>38</sup>. No que diz respeito à formação de placas ateroscleróticas que também envolvem processos inflamatórios, evidenciou-se a diminuição de IL-1 $\beta$  e IL-18 pela técnica ELISA em animais tratados com JTE0-13, comparados aos animais tratados apenas com veículo<sup>43</sup>. Dessa maneira, existem lacunas que precisam ser mais bem compreendidas, a fim de se conhecer o papel do antagonismo do receptor S<sub>1</sub>PR<sub>2</sub> na injúria cardíaca através da quantificação de células inflamatórias, fibrose e marcadores inflamatórios em camundongos infectados cronicamente com a doença de Chagas.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 A doença de Chagas

Restrita aos pequenos mamíferos que habitavam da Patagônia aos Estados Unidos, a doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Chagas. Os gambas, tatus e roedores coabitavam com os barbeiros, animal vetor da doença e a interação entre tais mamíferos e o barbeiro possibilitou a circulação do *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico da doença, que posteriormente fora descoberto pelo pesquisador. Com a chegada do homem ao habitat do barbeiro, seguido de desmatamentos e queimadas (desequilíbrio ecológico), os barbeiros foram desalojados e apropriaram-se das moradias. Aliado a isso, provou-se que o vetor hematófago consegue se alimentar de animais domésticos, tornando-os reservatório da doença e facilitando o contágio pelo homem moderno<sup>44</sup>. Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem entre 16 a 18 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* só na América Latina, ratificando que, mesmo após mais de 100 anos de descoberta, a doença continua negligenciada<sup>45</sup>.

O *T. cruzi* é um parasita muito resistente que mostra viver bem com mamíferos e os triatomíneos vetores, sendo capaz até mesmo de sobreviver a ultracongelamento  $-70^{\circ}\text{C}$  durante anos<sup>46</sup> e a  $4^{\circ}\text{C}$  no sangue de indivíduos, mostrando ainda capacidade infectante neste último, por uma a duas semanas<sup>47</sup>. O *T. cruzi* apresenta 3 formas diferentes em seu ciclo de vida (Figura 1). No hospedeiro vertebrado, verifica-se a forma de amastigota, descritas como intracelulares e tripomastigotas, formas sanguíneas. No hospedeiro invertebrado, achamos epimastigotas que, a posteriori, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. O tripomastigota é a forma infectante que vive no sangue do hospedeiro vertebrado e que pode ser colhido do hospedeiro invertebrado. A amastigota é o estágio do parasita dentro das células do humano. Por fim, a epimastigota é a forma não infectante, vista no hospedeiro invertebrado<sup>48</sup>. Os barbeiros se infectam por meio do sangue de humanos ou animais infectados com a forma tripomastigota. No sistema digestivo dos barbeiros, ocorrem mudanças em que as formas tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas. Após passar por sucessivas divisões, as formas epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas infectam os humanos e outros animais e se diferenciam em sua forma intracelular, os amastigotas. Estes, por sua vez, podem sofrer divisões dando origem às formas tripomastigotas na corrente sanguínea, podendo ser ingeridos pelo barbeiro e, por isso, dando continuidade ao ciclo<sup>49-51</sup>.

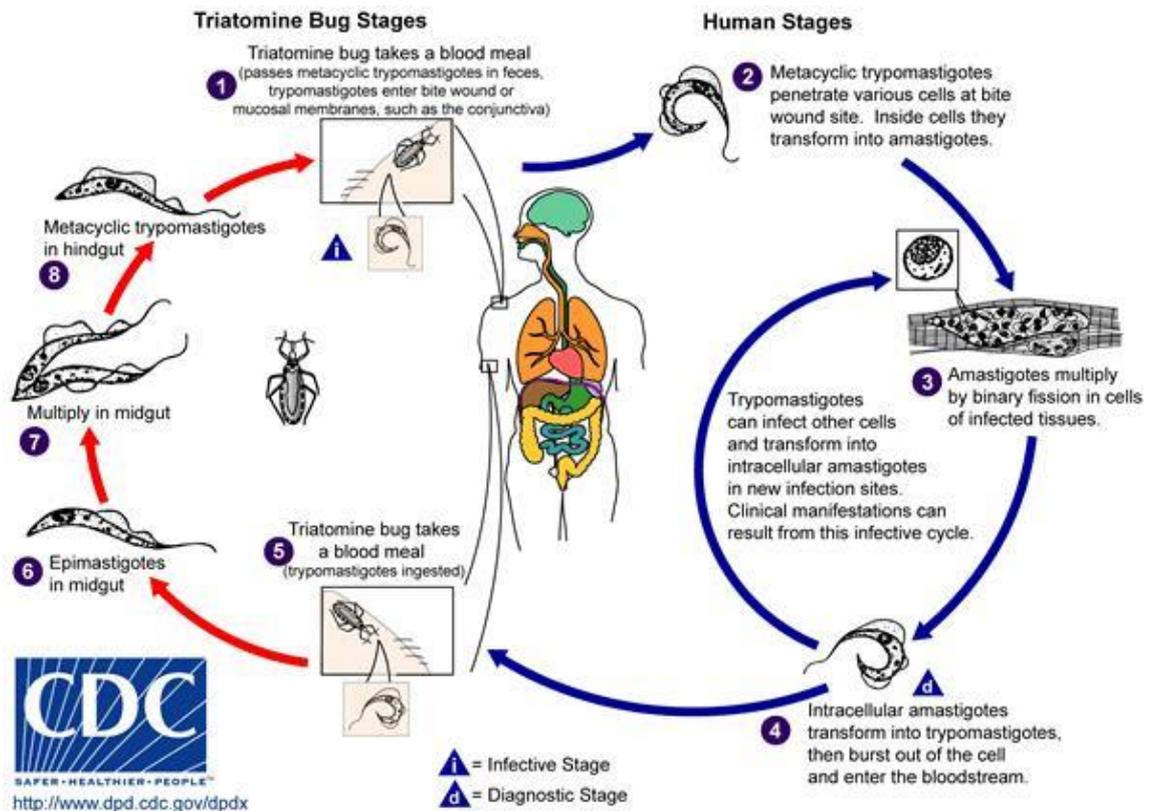


Figura 1. O ciclo de vida do *T. cruzi* em humano e animal vetor Fonte: <https://www.cdc.gov/media/subtopic/images.htm>. Acessado em: 10/07/2020

A doença possui como formas principais de transmissão as seguintes vias: vetorial, transfusional e materno-fetal. A forma vetorial é a mais comum e ocorre pela picada do barbeiro que invade o domicílio dos moradores, faz o repasto sanguíneo e defeca e urina no local da picada, apresentando coceira<sup>52</sup>, possibilitando a transmissão e inoculação do patógeno. A forma transfusional ocorre por meio dos transplantes de órgão é quase que impossível nos dias de hoje, devido ao cuidado com que é feita a coleta de sangue e aos exames laboratoriais que são mais acessíveis e rápidos de serem realizados, com resultados mais sensíveis e específicos. A vertical também se tornou uma forma de transmissão difícil, já que raramente são encontradas mulheres em idade fértil e portadoras da doença<sup>53</sup>. Além disso, sabe-se que a contaminação pelo *T. cruzi* pode vir de alimentos contaminados, como o açaí, importante fruta pelo seu teor calórico e proteico, principalmente na região norte do país<sup>54</sup>. Uma forma importante de transmissão que também não pode ser esquecida é a de acidentes com perfurocortantes em profissionais de saúde que pesquisam e lidam diretamente com a coleta de sangue dos indivíduos portadores de Chagas e animais usados nos modelos experimentais infectados com as cepas do *T. cruzi* (Figura 2)

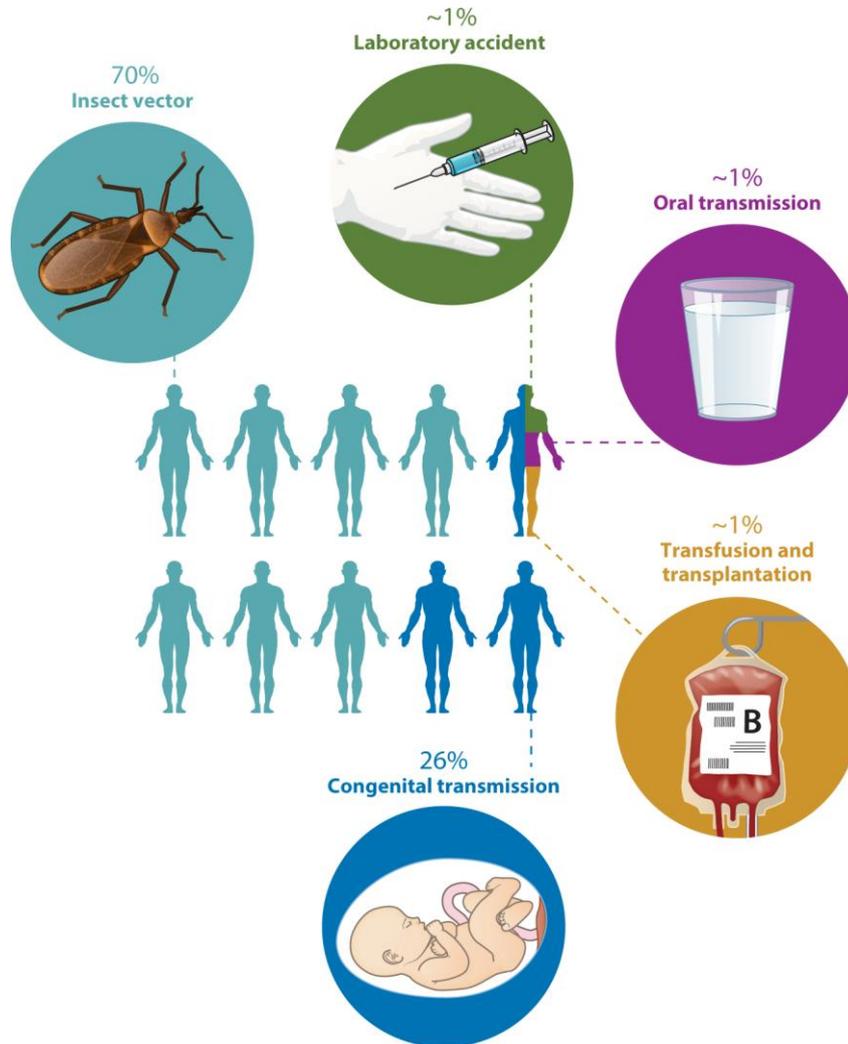


Figura 2: Modos de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Bonney & Luthringer, 2019.

De forma sucinta, podem ocorrer duas fases na infecção humana pelo *T. cruzi*. A primeira delas é uma fase aguda, em que encontramos maior circulação do patógeno no sangue, com a presença de febre que pode persistir por 12 semanas. Nela, pode-se encontrar sinais de inoculação como chagoma e o sinal de romanã, quando a picada é feita na pálpebra, caracterizada por vermelhidão e edema ocular. Nessa fase, os sinais e sintomas podem desaparecer sem maiores complicações, evoluir para fase crônica ou para modos agudos graves da doença<sup>55</sup>. Ainda, pacientes com transmissão oral na Venezuela apresentaram cefaleia, mialgia edema, com maiores taxas de letalidade na fase aguda<sup>56</sup>. Na fase crônica, existem poucos parasitas na corrente sanguínea, podendo haver comprometimento digestivo, cardíaco ou ambos. A maioria dos pacientes crônicos cursam com a forma indeterminada que consiste no indivíduo assintomático e sem sinais de comprometimento do aparelho digestivo e/ou cardíaco. Ela pode durar a vida toda ou evoluir para forma cardíaca, digestiva ou ambas.

Na forma cardíaca, os quadros mais comuns são a miocardiopatia dilatada e a insuficiência cardíaca congestiva e cerca de 30% dos casos evoluem para essa forma da doença. Na forma digestiva, mais rara, cerca de 10% dos pacientes cursam com megacólon ou megaesôfago<sup>55</sup>.

#### 4.2 Inflamação e fibrose

A inflamação consiste em uma resposta imunológica desencadeada por diversos fatores como patógenos, injúria celular e componentes tóxicos<sup>57</sup>. De uma forma geral, a inflamação é um mecanismo de defesa responsável pela cura<sup>58</sup>. Contudo, a inflamação aguda e incontrolável pode se tornar crônica, sendo responsável por diversas morbidades crônicas inflamatórias<sup>59</sup>. No que tange à injúria cardíaca observada em pacientes que apresentam a cardiopatia chagásica crônica (CCC), as fases críticas consistem em inflamação, evidenciada pela presença de infiltrado inflamatório, composto em sua maioria por macrófagos (50%), células T e células B (10%) , algumas poucas células NK<sup>60,61</sup> e linfócitos CD8+ e CD4+ na proporção de 2:1, com aumento do número de granzimas<sup>61</sup>. Além disso, ela também consiste na proliferação de fibroblastos e formação de cicatriz. Após essa fase, pode-se encontrar a expressão de várias citocinas pro-inflamatórias e fatores de fibrose levando à ativação e proliferação de miofibroblastos<sup>62</sup>.

Na fase aguda, tais moléculas desempenham papel central na infecção aguda pelo *T. cruzi*. Após o início da infecção, o DNA do patógeno e os glicoconjugados desencadeiam resposta imune inata via receptor Toll ligante 2, 4 e 9 em macrófagos e células dendríticas<sup>63</sup>. Depois da ativação dessas células, elas secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que são estimuladas, aumentando a endocitose e a morte intracelular, através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Nesse sentido, citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27 e TNF- $\alpha$  são prontamente liberadas por essas células, ativando ainda outras células inflamatórias<sup>64,65</sup>. Após os macrófagos e células dendríticas endocitarem o *T. cruzi*, há o estímulo de células T e anticorpos<sup>65</sup>. Dessa forma, o *T. cruzi* promove a liberação de IFN- $\gamma$ , e células T específicas são geradas, migrando com outros leucócitos sanguíneos para o local da infecção em resposta à produção de quimiocinas como, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10<sup>66</sup>. Essa inflamação mediada por células T leva ao controle, mas não a completa eliminação do parasita dos tecidos e da corrente sanguínea<sup>67</sup>.

Na fase crônica sintomática, as citocinas inflamatórias também são produzidas e as células mononucleares incrementam a produção de citocinas, conduzindo a aumentos

plasmáticos de TNF-  $\alpha$  e IFN-  $\gamma$ , que são até mesmo notados em indivíduos com a forma indeterminada da doença<sup>68-70</sup>. O grupo de pacientes que desenvolve a CCC possui grande número de alterações imunológicas evidenciadas por uma relevante exacerbação da resposta Th1. Tal exacerbação pode ser vista no sangue e é resultado da natureza do infiltrado inflamatório<sup>71</sup>. Os indivíduos que desenvolvem a CCC têm aumento da quantidade de TNF- $\alpha$  e CCL2, em comparação com os pacientes com a forma indeterminada da doença<sup>72</sup>. Além disso, pacientes com CCC, tem aumento da expressão de IFN-  $\gamma$  com subsequente aumento da CCR5<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, o que reduziu o número de células regulatórias produtoras de IL-10 e que expressam FOXP3<sup>+</sup>, quando comparado com pacientes que apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas<sup>67,69,73,74</sup>. Ainda, na CCC pode-se observar aumento da produção de iNOS, molécula responsável por promover a produção de resposta M1 de macrófagos, o que faz com que haja secreção de moléculas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN-  $\gamma$  e células Th1 promovendo atração de quimiocinas relacionadas à inflamação<sup>75</sup>.

Assim, pode-se observar que a produção de citocinas, células de defesa e quimiocinas, isto é, a inflamação, está intimamente relacionada a injúria cardíaca e à fibrose. Em relação aos mecanismos de fibrose, durante a fase de maturação, os miofibroblastos secretam colágeno e outras proteínas de matriz extracelular<sup>76</sup>. O propósito dessa forma adaptativa de fibrose é manter a integridade cardíaca e a geração de pressão, impedindo a disfunção miocárdica<sup>77</sup>. Porém, tal mecanismo quando mantido por excessivo número de fibroblastos e de produção de alta quantidade de proteínas de matriz extracelular, gera remodelamento cardíaco patológico, levando à alteração da estrutura do coração e tendo consequências devastadoras para a função cardíaca<sup>78</sup>.

Nesse sentido, a inflamação cardíaca na doença de Chagas resulta do alto grau de parasitemia, quando na fase aguda, e o intenso parasitismo tecidual, na fase crônica, principalmente. Como tem mostrado as discussões acerca da doença<sup>6,79,80</sup>, o desenvolvimento de técnicas de rastreamento identificou que a enfermidade é de fato uma cardiomiopatia resultante da contínua presença do *T. cruzi* nos tecidos<sup>6,81-84</sup>. A coleta de amostras de pacientes vivos evidenciou correlação entre as formas amastigotas do parasito e os intensos processo de inflamação no miocárdio<sup>35,85,86</sup>. Aliado a isso, modelos experimentais de humanos e animais identificaram correlação entre miocardite gerada pela inflamação ocasionada pelo parasito e a presença de falência cardíaca<sup>87,88</sup>. Apesar de todos os dados acerca da doença, o exato mecanismo que a causa não está completamente compreendido. Sabe-se que a resposta imune

por conta do parasito e a própria auto reatividade da infecção, possivelmente se juntam para promover, inflamação, miocitólise e a fibrose que é contínua e se sobrepõe a outros processos de fibrose, tornando- os características relevantes da cardiomiopatia chagásica<sup>7,80,82,89-95</sup>.

#### 4.3 A esfingosina-1-fosfato e o receptor $S_1PR_2$

Os esfingolipídios são moléculas responsáveis pela sinalização celular e o balanço entre sua síntese e degradação promovem a homeostase. No que diz respeito a seus papéis, eles são importantes na tradução do sinal intracelular e participam da proliferação, maturação e apoptose, sendo ainda, envolvidos nos processos de estresse celular<sup>96</sup>. Dentre os esfingolipídios, a ceramida (CER) é uma importante molécula que faz parte do seu grupo, servindo como precursora da forma biologicamente ativa responsável por atuar nos processos fisiológicos, a esfingosina-1-fosfato ( $S_1P$ )<sup>97,98</sup>. Através da catalização por hidrólise, a ceramidase leva à produção de esfingosina e, esta por sua vez, sofre fosforilação pelas enzimas esfingosina quinase 1 e 2 (SPKH1/2) e gera a  $S_1P$ <sup>99</sup> (Figura 3).

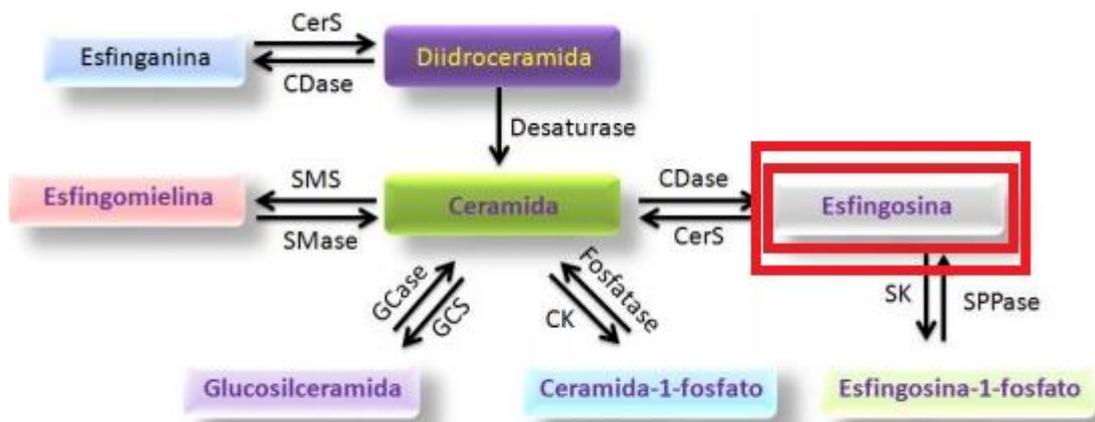


Figura 3. Interconversão entre os esfingolipídios de membrana, especial atenção para a via de produção da esfingosina-1-fosfato. Fonte: modificada de Fredi & Tinoco, 2015.

Como foi mencionado acima, o aumento da concentração de ceramida leva à elevação da quantidade de  $S_1P$ , o qual está envolvido na proliferação celular, mitose, angiogênese e na proteção contra apoptose (Figura 4)<sup>96</sup>.

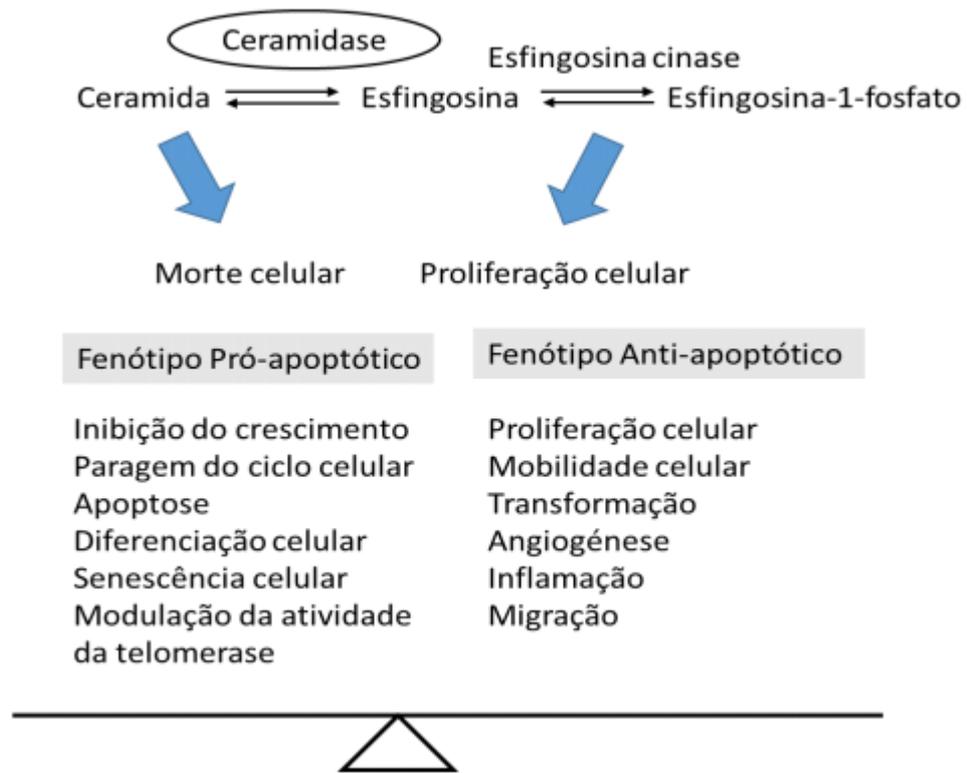


Figura 4. Fisiopatologia envolvida nos mecanismos de ação dos esfingolípídios. Fonte: Caldas, 2017.

Pensando-se no antagonista do  $S_1P_2$ , o JTE0-13 (Figura 5) é um bloqueador seletivo do receptor  $S_1PR_2$  que já foi testado para outras doenças inflamatórias, como as doenças fibróticas pulmonares. Em modelo experimental de camundongos C57BL/6J induzidos à inflamação pulmonar por administração de biomicina, importante quimioterápico que tem como um dos efeitos adversos a inflamação pulmonar e, conseqüentemente, fibrose<sup>100</sup>, identificou-se redução das citocinas inflamatórias no lavado bronco-alveolar dos camundongos tratados com JTE0-13 em comparação com os não tratados<sup>38</sup>. Além disso, mostrou-se também redução do acúmulo de fibroblastos e atenuação da produção de fibronectina e expressão diminuída do RNAm de colágeno-1- $\alpha$ -1, que são marcadores pró-fibróticos pulmonares<sup>101</sup>.

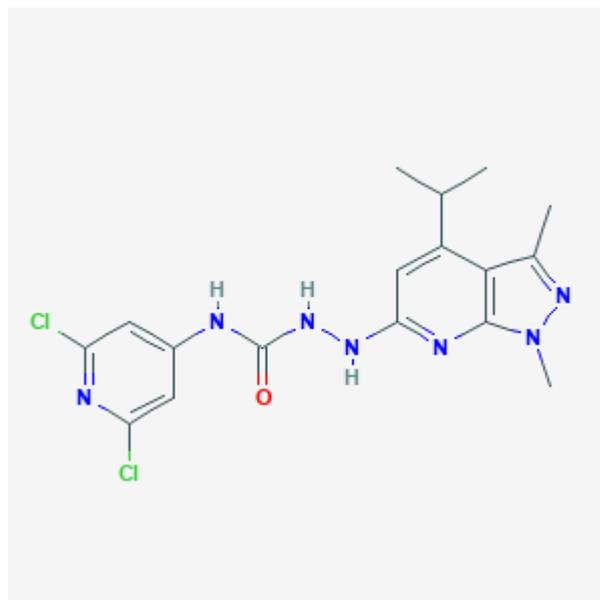


Figura 5: *Pyrazolopyridine analog*, o JTE-013. Molécula de JTE-013 em 2D. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrazolopyridine-analog>. Acessado em: 03/05/2021.

Estudos recentes sugerem que a ativação do receptor  $S_1PR_2$  é um pivô nos processos de fibrose patológica renal na nefropatia diabética, atuando de maneira a diminuir inflamação e fibrose patológica<sup>102</sup>. No diabetes mellitus, o aumento da concentração de glicose pode ativar a sinalização do  $S_1P$ , que promove a proliferação de células mesangiais, relatadas por participarem da fibrose renal, processo precursor da glomeruloesclerose<sup>103</sup>. Além disso, tem-se que a hiperglicemia gera aumento da produção de TGF- $\beta$ 1, que também participa da produção de proteínas de matriz extracelular, através da deposição de fibronectina e colágeno tipo IV, contribuindo para os processos de fibrose tecidual<sup>104</sup>. Com o aumento do TGF- $\beta$ 1 promovido pela hiperglicemia, temos a ativação da cascata de sinalização Smad, referida por induzir o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) em que as células epiteliais perdem a polaridade e sofrem dramático remodelamento em seu citoesqueleto. Tais mudanças, associadas a expressão de outros fatores como a proteína 1 específica de fibroblastos (FSP1), fibronectina e colágenos, sugerem que a EMT esteja envolvida em processos de injúria e fibrose renal<sup>105</sup>.

Analisando-se a via terapêutica do  $S_1P$ , sabe-se que no que diz respeito às vias envolvendo o  $S_1P$  e seu receptor  $S_1PR$ , o bloqueio da enzima responsável por converter a esfingosina  $S_1P$ , promovido pelo N- dimetil-esfingosina (DMS), mostrou-se como importante droga capaz de reduzir inflamação e fibrose no coração de camundongos cronicamente infectados com o *T. cruzi*. Tais resultados tornaram-se perceptíveis pela redução de NOS2,

TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , assim como outros importantes marcadores inflamatórios, vistos também no presente estudo, o que mostra a importância da elucidação dessa via como importante ferramenta enquanto arsenal terapêutico<sup>106</sup>. Apesar das informações existentes, não há dados na literatura que esclareçam sobre a participação da via S<sub>1</sub>P-S<sub>1</sub>P<sub>2</sub> na atenuação dos efeitos deletérios encontrados na CCC e por isso torna-se premente o bloqueio dessa via a fim de utilizá-la como alvo farmacológico para o tratamento dos indivíduos portadores da CCC.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Desenho, local e período do estudo

Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, utilizando um modelo de cardiopatia chagásica crônica murino, cujos animais apresentam algumas características semelhantes a doença humana. O presente trabalho está de acordo com os princípios de ética em pesquisa com animais vigentes na Lei 11.784/2008 aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEUA/HSR), sob protocolo 007/18. A pesquisa foi desenvolvida no HSR e no instituto Gonçalo Muniz (FIOCRUZ-BA) entre os anos de 2018 e 2021. Foram utilizados camundongos C57Bl/6 fêmeas (6-8 semanas) mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia celular do Hospital São Rafael (HSR), em ambiente controlado de umidade e temperatura, tendo água e comida *ad libitum*. Foram adotadas as normas de uso de animais em laboratório a fim de minimizar o desconforto animal.

### 5.2 Infecção e parasitemia

Os camundongos foram infectados através da inoculação de  $10^2$  tripomastigotas de *T. cruzi*, por via intraperitoneal. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana foram obtidas do sobrenadante da cultura de células de rim de macaco (LLC-MK2) infectadas.

### 5.3 Critérios de inclusão e critérios de exclusão

Após a inoculação do *T. cruzi*, a parasitemia dos animais foi acompanhada até os 60 dias pós-infecção. Aqueles animais que tiveram parasitemia positiva foram incluídos no estudo. Os animais que apresentaram ferimentos decorrente de brigas dentro das caixas ou que apresentaram sinais de estresse, como caimento de pelo ou outro sinal não relacionado com a doença de Chagas, e ainda, aqueles que demonstraram parasitemia negativa até os 50 dias pós-infecção foram excluídos do estudo.

### 5.4 Grupos experimentais e tratamento

Os camundongos chagásicos crônicos foram divididos em dois grupos: (a) chagásicos crônicos tratados com uma dose de JTE0-13 (30 mg/kg) por gavagem em uma única administração (n=10); (b) chagásicos crônicos tratados apenas com o veículo, mesma via (n=10) e igual período de tempo. Animais não infectados da mesma idade e sexo foram utilizados como controle (n=5). Os animais foram eutanasiados uma semana após o

tratamento por administração de dose letal de anestésico (Figura 6). O cálculo amostral e o número de animais foram determinados tomando como base o estudo publicado por Damy e colaboradores (2010). De acordo com esse trabalho, 8 animais em cada grupo, tanto nos animais tratados com salina quanto nos animais tratados com veículo já são o suficiente para se obter resultados com nível de significância estatística, assumindo 20% do tamanho do efeito esperado entre o grupo controle e o tratado, e 20% de variabilidade biológica. O número de animais escolhido 10 em vez de 8 ocorre em função do percentual de mortes de animais, que chega a 20% por causa da infecção crônica por *T. cruzi*<sup>107</sup>.

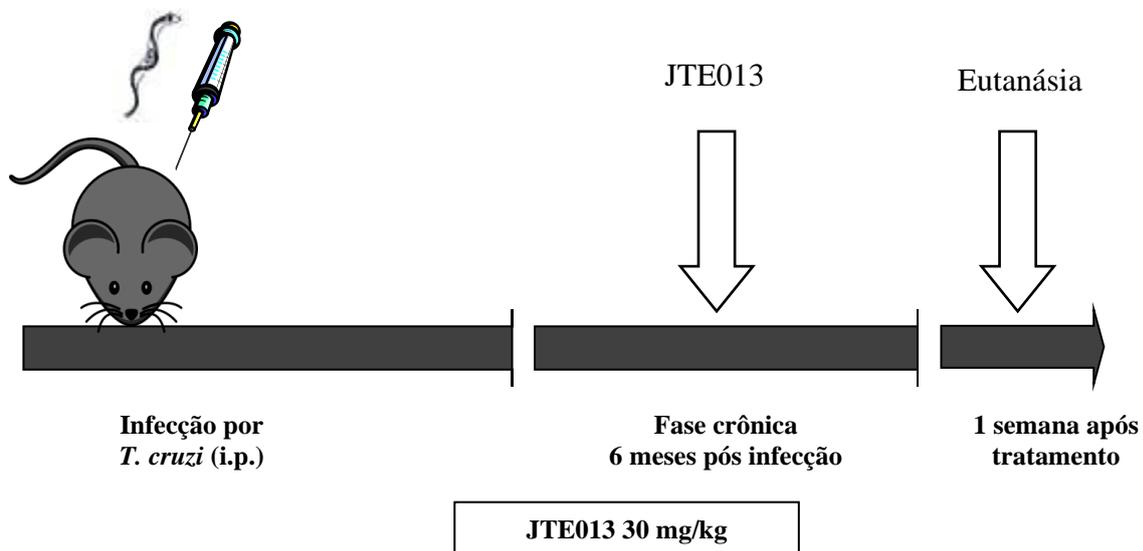


Figura 6 – Delineamento experimental. Camundongos da linhagem C57Bl6 foram infectados e o tratamento se iniciou após seis meses de infecção.

### 5.5 Eutanásia e coleta de material

A eutanásia foi realizada através da injeção letal de anestésico xilazina (Sedomin®; Konig) e ketamina (Vetanarcol®; Konig, Avellaneda, Argentina). Com os animais anestesiados, foi coletado sangue do plexo braquial e, após a eutanásia coletou-se o coração dos animais. O sangue foi coletado com EDTA e centrifugado a 10°C, 1500 rpm por 10 minutos a fim de se separar o plasma que foi armazenado em freezer -80 °C. Os corações foram divididos ao meio, do átrio em direção ao ventrículo, metade foi fixado em PFA 4%

para confecção de lâminas histológicas e metade foi congelado em criotubo para extração de RNA.

### 5.6 Coloração de lâminas

A metade dos corações dos camundongos fixada em PFA foi emblocada em parafina, e processada para confecção das lâminas histológicas. A técnica de coloração consistiu em primeiramente desparafinizar a lâmina, depois hidratá-la com diferentes concentrações de álcool (absoluto, a 80%, 70%) e em água destilada. Para análise de infiltrado inflamatório, as lâminas desparafinizadas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Após esse processo, a lâmina foi passada em água acética a um por cento, depois três vezes em álcool absoluto, uma vez em xilol e então ela foi montada com bálsamo do Canadá e lamínulas. Para a análise de fibrose as lâminas foram coradas com Sirius Red (PIFG) e então foram lavadas em água corrente. Depois, a lâmina foi contra corada em solução light green e novamente lavada em água corrente e destilada. Depois desse processo, a lâmina foi desidratada, clarificada e montada com bálsamo do Canadá. As fibras reticulínicas e colagênicas foram coradas em vermelho e o restante do tecido fica esverdeado.

### 5.7 Quantificação da inflamação e fibrose cardíaca

As lâminas foram analisadas por microscopia de campo claro após terem sido coradas e então fotografadas. As imagens foram digitalizadas usando uma câmera digital CoolSnap adaptada ao microscópio AX-70 (Olympus) e analisadas usando o programa Image Pro Plus versão 6.0 (Media Cybernetics), permitindo a contagem das células do infiltrado inflamatório em dez campos por corte de coração integradas por área. O percentual de fibrose foi determinado usando o mesmo programa, integrando as áreas de tecido fibrótico e não-fibrótico em cada campo, em cortes de coração corados com Sirius Red.

### 5.8 Análise da expressão gênica por PCR

O RNA dos corações foi extraído com TriZol® Reagent e, a partir daí, realizou-se a sua quantificação por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm. Foi utilizado um kit de transcrição reversa para a síntese de cDNA. O RNA total, na quantidade de 1µg, foi adicionado a 5µL de primers, 5µL de tampão Strand, 2µL de DNTP mM e 3µL de enzima. Este volume foi completado com água tratada com dietilpirocarbonato até 50µL e incubada a 25°C por 10 minutos e a 37°C por 2 horas. A análise da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,

FOXP3 e CD45 foi feita por PCR em tempo real preparando uma placa de 96 poços utilizando o reagente Taqman.

### 5.9 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o teste ANOVA ou teste de comparação múltipla Newman-Keuls multiple, com o programa Prism versão 6.0 (Graph Pad Software). Os valores de todas as variáveis foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

Após a infecção pelo parasito *T. cruzi*, a parasitemia foi acompanhada até 60 dias pós-infecção e como observado na figura 1, o pico da parasitemia ocorreu por volta dos 30 dias pós-infecção como esperado para esta cepa e em seguida reduziu até chegar a zero no dia 60 (Figura 7). Os animais foram mantidos no biotério por seis meses após a infecção para o início do tratamento durante a fase crônica.

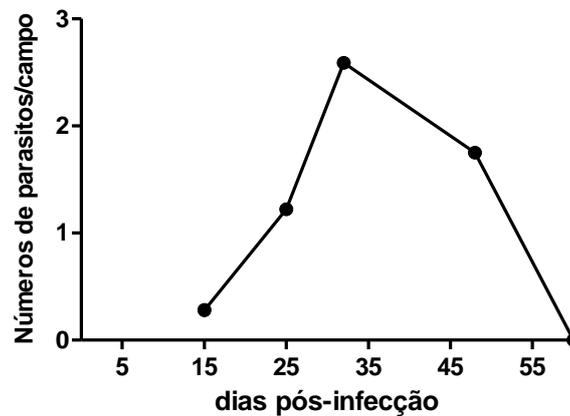


Figura 7. Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $10^2$  *T. cruzi* da cepa colombiana e avaliou-se o número de parasitos por campo durante vários tempos pós-infecção até 60 dias.

As lâminas dos corações de camundongos controle, infectados com *T. cruzi* e tratados com salina ou tratados com JTE0-13 foram analisadas e pode-se evidenciar redução importante do número de células inflamatórias no grupo de camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* tratados com o fármaco JTE0-13 quando comparado aos animais infectados e não tratados (NT), apresentando diferença estatística com  $P < 0,01$  (Figura 8).

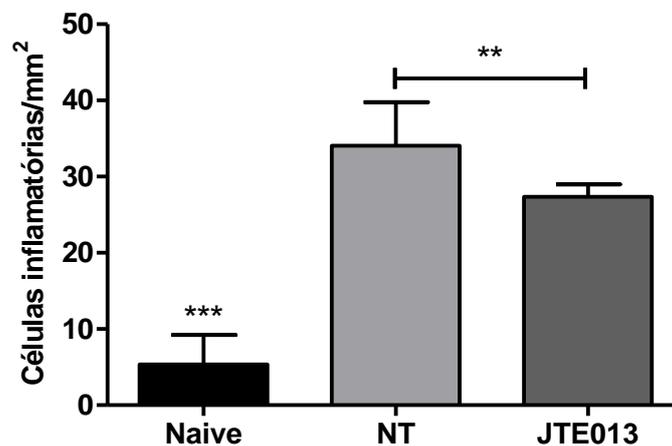


Figura 8. Células inflamatórias foram quantificadas em lâminas de corações de camundongos infectados pelo *T. cruzi* nos grupos controle (Naive), não tratados (NT) e tratados com JTE0-13. As barras representam as médias  $\pm$  EPM de 10 camundongos/ grupo: \*\*\* P <0,001; \*\* P <0,01 em comparação ao grupo não tratado.

O percentual de fibrose foi avaliado em lâminas de coração dos diferentes grupos 6 meses pós-infecção. O percentual de fibrose é representado pela porcentagem de deposição de colágeno no coração de animais controle (naive), infectados e não tratados ou infectados e tratados com JTE0-13. Apesar de haver redução da inflamação, não foi observado redução de fibrose após o tratamento com JTE0-13. Foi observada uma tendência de redução no grupo tratado, no entanto sem apresentar diferença estatística (Figura 9).

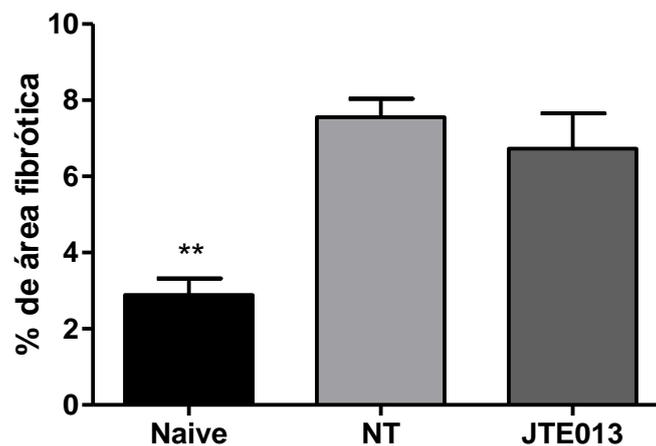


Figura 9. Quantificação da área fibrótica em corações de camundongos C57BL/6 dos diferentes grupos experimentais. As barras representam as médias  $\pm$  EPM de 10 camundongos/ grupo: \*\* P <0,01 em comparação ao grupo controle.

A CCC tem sido associada com aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em camundongos, assim como em humanos. Foi observado um aumento da expressão dessas duas citocinas pró-inflamatórias nos animais infectados e não tratados em comparação com animais controle, que não foram infectados (Figura 10A, D). A expressão de iNOS, marcador da resposta M1 da ativação de macrófagos que se encontra aumentado nos corações de camundongos infectados com *T. cruzi*, foi reduzido após o tratamento com JTE0-13 (Figura 10B). A expressão de CD45, marcador de leucócitos, que está aumentado em camundongos infectados não tratados, sofreu diminuição após o tratamento com JTE0-13 (Figura 10C) A

administração do JTE0-13 promoveu redução da expressão de ambas as citocinas no coração dos camundongos por análise de expressão gênica. Avaliou-se a expressão de colagenase-1 (COL-1), importante molécula relacionada ao desenvolvimento de fibrose, e não houve redução significativa nos animais infectados tratados com JTE0-13 em comparação com os animais infectados não tratados (Figura 10E). A expressão de FOXP3, fator de transcrição expresso por células T regulatórias presente nas vias anti-inflamatórias, apresentou aumento nos animais infectados tratados com JTE0-13 em comparação dos animais infectados não tratados (Figura 10F), mostrando papel relevante do JTE0-13, possivelmente na ativação de células T regulatórias.

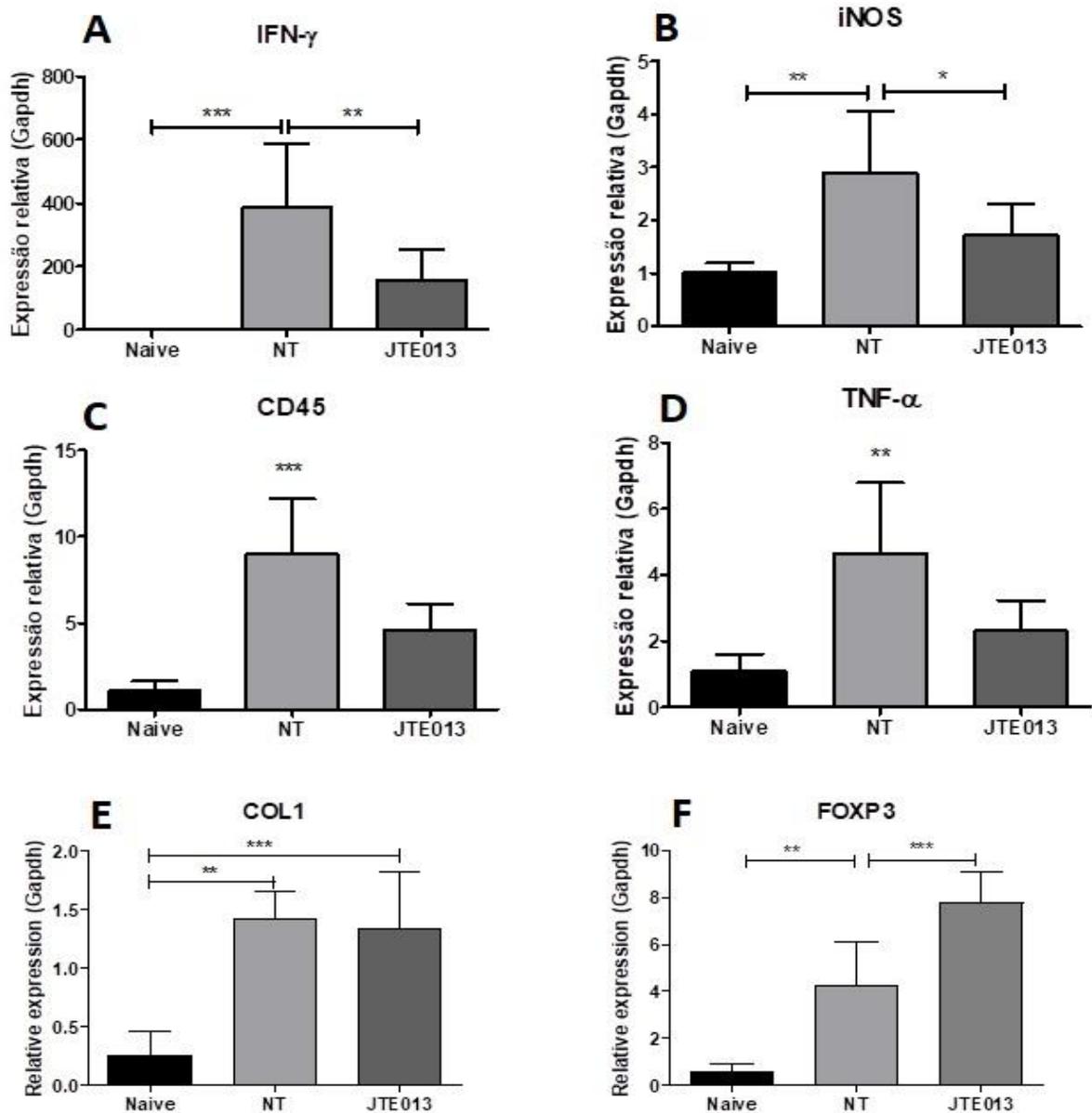


Figura 10. Expressão gênica nos corações dos camundongos nos diferentes grupos experimentais. A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica *real time* qRT-PCR usando amostras de cDNA preparadas a partir de mRNA extraída dos corações dos camundongos controle (naive) e dos camundongos infectados não tratados e dos camundongos infectados tratados com JTE0-13. Expressão gênica de (A) IFN-  $\gamma$ , (B) iNOS, (C) CD45, (D) TNF- $\alpha$ , (E) COL1, (F) FOXP3. As barras representam as médias  $\pm$  EPM de 10 camundongos/ grupo: \*\*\* P < 0,001; \*\* P < 0,01; \* P < 0,05 em comparação aos infectados não tratados. #P < 0,05 em comparação com o grupo controle.

## 7. DISCUSSÃO

A cardiopatia chagásica crônica é uma enfermidade que está associada ao desenvolvimento de inflamação crônica que culmina com a fibrose patológica. A procura de novas drogas capazes de diminuir a progressão da doença é de interesse terapêutico, já que não há cura para a fase crônica da doença de Chagas. Pensando-se em possíveis alvos terapêuticos, os esfingolipídios são importantes moléculas envolvidas nos mais diversos processos do metabolismo celular, como angiogênese, tráfico celular e sobrevivência celular<sup>96</sup>. A imunomodulação dos fatores que ativam as vias de produção de linfócitos e, conseqüentemente, a produção de moléculas inflamatórias faz parte da via do S<sub>1</sub>P, fazendo com que esse esfingolipídio seja atrativo para investigação.

Nesse trabalho demonstramos pela primeira vez que o tratamento com um antagonista do receptor S<sub>1</sub>P<sub>2</sub> em modelo murino de CCC promove redução de inflamação e mediadores envolvidos com o processo inflamatório. Foi observada diminuição da inflamação após a administração do JTE0-13 nos camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, representado tanto pela quantificação do número de leucócitos em lâminas de corações, como também pela análise da expressão gênica de CD45, um pan-marcador de leucócitos. A exacerbação da inflamação resulta da produção de marcadores inflamatórios e, na CCC, pode-se visualizar o aumento de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , iNOS e CD45, importantes marcadores pró-inflamatórios. Após tratamento com JTE0-13 houve redução da inflamação e dos marcadores pró-inflamatórios, além de aumentar a produção de FOXP3, o qual participa regulando a inflamação.

O IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são citocinas pro-inflamatórias, envolvidas na ativação de células do sistema imunológico e na migração de leucócitos. Na CCC, essas são duas citocinas que promovem miocardite e perda de células cardíacas<sup>68,69</sup>. Após o uso de JTE0-13, visualizou-se diminuição da expressão dessas moléculas, seja causando redução da inflamação, ou como consequência da redução do infiltrado inflamatório, não podemos afirmar com os dados observados. O iNOS representa um importante marcador de inflamação, visto que participa da produção de NO, importante vasodilatador que está presente nos processos inflamatórios, participando da resposta M1 dos macrófagos, resposta essa que está relacionada a secreção de TNF- $\alpha$  e célula Th1 que atraem quimiocinas, participando no início e na sustentação da inflamação<sup>75</sup>.

As células T regulatórias são importantes componentes da regulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, que também estão presentes na inflamação da CCC. A análise da expressão de células T é realizada por meio da expressão gênica da proteína FOXP3, a qual participa dessa via<sup>108</sup>. O aumento da produção de FOXP3 no grupo em que foi feito o tratamento com o fármaco JTE0-13 mostra que o JTE0-13 pode exercer função de atenuar a expressão desses linfócitos e, portanto, reduzir os processos de injúria cardíaca.

A quantificação do percentual de fibrose após tratamento com JTE0-13 em comparação com os corações não tratados e nos animais controle evidencia que a utilização desse fármaco não reduziu a fibrose, não tendo, ainda, evidência significativa em reverter a fibrose miocárdica proporcionada pela injúria crônica. Ponderando sobre a diminuição da fibrose, assim como mostrou-se redução não significativa no percentual de fibrose miocárdica, há concordância da não redução da expressão de COL-1, importante molécula que participa do remodelamento cardíaco. De maneira discordante dos nossos dados, a administração de JTE0-13 mostrou ser capaz de diminuir o padrão de fibrose pulmonar e renal em modelo de estudos realizados previamente<sup>109,110</sup>.

Há hipótese de que o S1P atue tanto na via intracelular, com o papel de reduzir fibrose, quanto na via extracelular, com o efeito de promover fibrose patológica, portanto, com papéis dicotômicos dependendo da região encontrada, dentro ou fora da célula. É sugestivo que o efeito da não redução da fibrose patológica no modelo de doença de Chagas crônico em comparação com os indivíduos portadores de doença renal fibrótica, em que houve de fato diminuição do perfil de fibrose com o tratamento com JTE-013, possa estar relacionada a expressão cardioprotetora reduzida de moléculas expressas dentro do cardiomiócito em contrapartida com as células renais. A via do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), regulada positivamente pelo TGF- $\beta$ , pode ter regulação menor ou menos importante nas células miocárdicas, o que é mais expressivo na expressão de células renais dos pacientes com patologia fibrótica<sup>111</sup>. Portanto, o TGF- $\beta$  seria uma molécula interessante para análise em modelo experimental de CCC no tratamento com JTE-013.

É possível que a via que interrompa o processo de fibrose esteja relacionada a outros receptores. Como foi analisado no estudo com DMS, em que a partir da utilização desse fármaco que atua bloqueando a conversão de esfingosina-1-fosfato a partir da esfingosina, observou-se diminuição do percentual de fibrose no coração dos animais infectados e tratados com o DMS. Este, portanto, atuou bloqueando toda a via a partir da não produção de S<sub>1</sub>P,

evidenciando que pode existir um receptor em específico que pode estar relacionado a fibrose. Portanto, dentre os outros receptores é provável que o bloqueio seletivo de outro receptor possa diminuir a fibrose miocárdica da CCC<sup>106</sup>.

A fim de complementar esses dados, é necessário o estudo dos mecanismos envolvidos na redução da inflamação e se isso ocasionaria ressurgência da parasitemia, o que inviabilizaria o uso de tal substância em pacientes com CCC. Apesar de não reduzir fibrose na dose estudada, o JTE0-13 mostrou-se um fármaco capaz de reduzir citocinas inflamatórias e reduzir inflamação, que é o processo precursor da fibrose, podendo se tornar uma droga capaz de atenuar a progressão da cardiopatia chagásica e promover qualidade de vida para os pacientes cronicamente infectados e sem tratamento definitivo para essa enfermidade.

## **8. CONCLUSÃO**

O tratamento com o fármaco JTE0-13 reduziu inflamação no coração dos camundongos infectados tratados comparado com o controle não-tratado, porém não houve redução significativa do percentual de fibrose desses corações na dose de 30 mg/Kg. A redução da inflamação pode representar um benefício significativo para o paciente com CCC no entanto novos estudos, com desenhos específicos, são necessários para que o JTE0-13 possa ser utilizado no tratamento da CCC.

## REFERÊNCIAS

1. PAHO. Chagas disease in the Americas: a review of the current public health situation and its vision for the future. 2018;(May):3–4.
2. Nogueira FB. Estudo dos genes que codificam as proteínas antioxidantes em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol. 2009;151.
3. Villela MM, Rodrigues VLCC, Casanova C, Dias JCP. Análise da fonte alimentar de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, *Triatominae*) e sua atual importância como vetor do *Trypanosoma cruzi*, no Estado de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(2):125–8.
4. Ribeiro AL, Rocha MO. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31(3):301–14.
5. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet [Internet]. 2010;375(9723):1388–402. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
6. 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. Vol. 138, Circulation. 2018. 169–209 p.
7. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões M V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation. 2007;115(9):1109–23.
8. Sales PA, Molina I, Murta SMF, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(5):1289–303.
9. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G. Annals of Internal Medicine Article Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. Ann Intern Med. 2006;
10. Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, Del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: Parasitological, serological and clinical evolution. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(1):1–10.
11. Cardoso CS, Ribeiro ALP, Oliveira CDL, Oliveira LC, Ferreira AM, Bierrenbach AL,

- et al. Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(11):1–12.
12. Geral C, Transmissíveis D. Informe Técnico Recomendações Sobre O Diagnóstico Parasitológico, Sorológico E Molecular Para Confirmação Da Doença De Chagas Aguda E Crônica 1 Ministério Da Saúde Secretaria De Vigilância Em Saúde Departamento De Vigilância Epidemiológica. *Rev Patol Trop* [Internet]. 2013;42(4):475–8. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/>
  13. CONITEC, Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. Comissão Nac Inc Tecnol no SUS. 2018;1–144.
  14. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295–306.
  15. Kratz JM. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. *Acta Trop*. 2019;198(April).
  16. Torrico F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-Vega C, Pinazo MJ, Schijman A, et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(4):419–30.
  17. Chatelain E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2017;15:98–103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.002>
  18. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Avilés AS, et al. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic chagas disease: Risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6125–31.
  19. Godoy HL, Guerra CM, Viegas RF, Dinis RZ, Branco JN, Neto VA. Infections in heart transplant recipients in Brazil : The challenge of Chagas ' disease. *HEALUN* [Internet]. 2010;29(3):286–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2009.08.006>
  20. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Marin-neto JA, Maguire JH, Acquatella H, et al. CLINICIAN ' S CORNER Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review. 2015;298(18):2171–81.
  21. Campos S V, Strabelli M V, Neto A, Silva CP. Risk Factors for Chagas ' Disease Reactivation After Heart Methods : Results : 2004;597–602.

22. Bestetti RB, Theodoropoulos TAD. Review Articles A Systematic Review of Studies on Heart Transplantation for Patients With End-Stage Chagas' Heart Disease. *J Card Fail* [Internet]. 2009;15(3):249–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2008.10.023>
23. Benatti RD, Oliveira GH, Bacal F. Author's Accepted Manuscript. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2017.02.006>
24. Jackson Y, Dang T, Schnetzler B, Pascual M, Meylan P. *Trypanosoma cruzi* fatal reactivation in a heart transplant recipient in Switzerland. *HEALUN* [Internet]. 2011;30(4):484–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2010.11.015>
25. Gómez-p CF, Mantilla-h JC. Fatal Chagas Disease Among Solid- Organ Transplant Recipients in. :2–5.
26. Urbina JA, Dubourdiou M, Luis J. The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes : protein and lipid composition. 2004;106:135–49.
27. Slessor M. Energy analysis: as an economic tool. *Comm Eur Communities*. 1979;126(EUR 6397 EN):129–42.
28. Rodrigues C, Catisti R, Uyemura SA, Vercesi IAE, Lira R, Rodriguez C, et al. The Sterol Composition of. 1992;588–94.
29. Molina I, Gómez I Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014;370(20):1899–908.
30. Lima RS, Soares MBP, Santos RR. Terapia celular na doença de Chagas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(SUPPL. 1):87–92.
31. Ferreira BL, Ferreira ÉR, de Brito M V., Salu BR, Oliva MLV, Mortara RA, et al. BALB/c and C57BL/6 mice cytokine responses to *Trypanosoma cruzi* infection are independent of parasite strain infectivity. *Front Microbiol*. 2018;9(MAR):1–12.
32. Means CK, Brown JH. Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. 2009;82(2):193–200.
33. Kacimi R, Vessey DA, Honbo N, Karliner JS. Adult cardiac fibroblasts null for sphingosine kinase-1 exhibit growth dysregulation and an enhanced proinflammatory response. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(1):85–91.
34. Serrano A, Milara J, Navarro R, Juan G, Peiro T, Morcillo E, et al. Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition.

35. Li C, Chi XX, Xie W, Strong JA, Zhang JM, Nicol GD. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 antagonist JTE-013 increases the excitability of sensory neurons independently of the receptor. *J Neurophysiol*. 2012;108(5):1473–83.
36. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs. 2012;
37. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine- 1 - phosphate in immunity. *Nat Publ Gr [Internet]*. 2011;(May):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2974>
38. Yang L, Han Z, Tian L, Mai P, Zhang Y, Wang L, et al. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 and 3 Mediate Bone Marrow- Derived Monocyte / Macrophage Motility in Cholestatic Liver Injury in Mice. *Nat Publ Gr [Internet]*. 2015;(January):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep13423>
39. Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ, et al. Kupffer cell heterogeneity : functional properties of bone marrow – derived and sessile hepatic macrophages. 2016;110(12):4077–86.
40. Marra F, Aleffi S, Galastri S, Provenzano A. Mononuclear cells in liver fibrosis. 2009;345–58.
41. Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, Robson AJ, Gordon-walker TT, Hartland S, et al. Macrophage Therapy for Murine Liver Fibrosis Recruits. 2011;2003–15.
42. Ramachandran P, Iredale JP. Hepatology Snapshot Macrophages : Central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution Hepatology Snapshot. *J Hepatol [Internet]*. 2012;56(6):1417–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.10.026>
43. Skoura A, Michaud J, Im DS, Thangada S, Xiong Y, Smith JD, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):81–5.
44. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. *Usp [Internet]*. 1989;52. Available from: <http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/viewFile/57188/60171>
45. Westphalen EVNA, Bisugo MC, Araújo M de FL. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *Secr Estado da Saúde São Paulo [Internet]*. 2012;9(105):17–34. Available from: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/bepa/txt/bepa105\\_chagas.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/bepa/txt/bepa105_chagas.htm)
46. Pereira Neves D, Parasito-Hospedeiro R, Wagner de Almeida Vitor R, Mastigophora S, Barbosa Reis A. . Glossário, 3 5. Protozoa, 33 Oduir Genaro (in memoriam) Odair

- Genaro (in memoriam).
47. Pruneda J, Dias E. Enfermedad de Chacas y la transfusion de sangre; res . J . A . Cerisola ‘, A . Rabinovich 2 , M . Alvarez 1 , C . A . Di Corleto 1. 1936;
  48. Siqueira-batista R. Moléstia de Chagas e ecologia profunda: a “luta antivetorial” em questão Chagas’s disease and deep ecology: the anti-vectorial fight in question. Cien Saude Colet. 2011;16(2):677–87.
  49. Burleigh BA. The Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Mammalian Cells. Annu Rev Microbiol. 1995;49(1):175–200.
  50. Tanowitz HB, Kirchhoff L V., Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas’ disease. Clin Microbiol Rev. 1992;5(4):400–19.
  51. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Annual review of microbiology; 1973; Belo Horizonte: Departamento de Parasitologia, I.C.B., Universidade Federal de Minas Gerais and Instituto de Endemias Rurais.
  52. Secretaria de Saúde Bahia. Boletim Epidemiológico de Doenças de Chagas , janeiro de 2018 Ign / Branco Confirmado Descartado Inconclusivo Total. Diverp - Suvisa. 2018;(Dc).
  53. Carvalho NB, Atala MM, Leite RM, Yasuda MAS. Manual de Atendimento a Pacientes com Doença de Chagas. Faculdade de Medicina da USP. 2015. 67 p.
  54. Barroso Ferreira RT, Branquinho MR, Cardarelli-Leite P. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. Vigilância Sanitária em Debate. 2014;2(4):4–11.
  55. Arruda C. Doença de Chagas Doença de Chagas. BMJ Glob Heal. 2019;(Figura 1):1–18.
  56. Santos VRC, de Meis J, Savino W, Andrade JAA, Vieira JR dos S, Coura JR, et al. Acute chagas disease in the state of Pará, amazon region: Is it increasing? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018;113(5):2–7.
  57. Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. Cell. 2010;140(6):771–6.
  58. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. Cell [Internet]. 2010;140(6):871–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
  59. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-κB Signaling Pathway. Kidney Blood Press Res. 2016;41(6):901–10.
  60. Milei J, Storino R, Fernandez Alonso G, Beigelman R, Vanzul S, Ferrans VJ.

- Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy immunohistochemical and ultrastructural findings. *Cardiol.* 1992;80(5–6):424–37.
61. Keating SM, Deng X, Fernandes F, Cunha-Neto E, Ribeiro AL, Adesina B, et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *Int J Cardiol* [Internet]. 2015;199:451–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.07.040>
  62. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2011;123(6):594–604.
  63. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol.* 2006;177(6):3515–9.
  64. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon- $\gamma$  axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* [Internet]. 2001;159(5):1723–33. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63019-2)
  65. Bilate AMB, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: Current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(2):67–74.
  66. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002;18(6):262–5.
  67. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(SUPPL. 1):252–8.
  68. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Asymptomatic/"Indeterminate" and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(3):407–11.
  69. Abel LCJ, Rizzo L V., Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001;17(1):99–107.
  70. Ribeiro M, Pereira-Chiocola VL, Rénia L, Filho AAF, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 2000;22(1):49–53.

71. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* [Internet]. 2005;167(2):305–13. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62976-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62976-8)
72. Talvani A, Rocha MOC, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Chagasic Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. 2004;38(7):943–50.
73. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Busek SCU, Tekeira MM, Silva JS, et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005;73(12):7960–6.
74. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003;71(3):1185–93.
75. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio*. 2013;4(3).
76. Samuel JL, Delcayre C. Cardiac fibrosis. *Bull Acad Natl Med*. 2017;201(4–6):775–84.
77. Van Den Borne SWM, Diez J, Blankesteyn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2010;7(1):30–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2009.199>
78. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2000;15(4):264–72.
79. Köberle F. Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. *Adv Parasitol*. 1968;6(C):63–116.
80. Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today*. 1996;12(10):396–9.
81. Bellotti G, Bocchi EA, De Moraes AV, De Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, et al. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J*. 1996;131(2):301–7.
82. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001;31(5–6):550–4.

83. You A Ben. Persistence chronically of *Trypanosoma* infected mice wuzl antigens in the inflammatory lesions of. 1988;
84. Higuchi M de L, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993;2(2):101–6.
85. Palomino SAP, Aiello VD, Higuchi ML. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: The association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol*. 2000;94(6):571–9.
86. Olivares-Villagómez D, Mccurley TL, Vnencak-Jones CL, Correa-Oliveira R, Colley DG, Carter CE. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(4):563–70.
87. De Higuchi ML, Floriano Morais C De, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, et al. The Role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic chagas' disease: A study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol*. 1987;10(11):665–70.
88. Bilate AMB, Salemi VMC, Ramires FJA, De Brito T, Silva AM, Umezawa ES, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: A quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect*. 2003;5(12):1116–24.
89. Andrade ZA. Immunopathology of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):71–80.
90. Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. The challenges of Chagas disease - Grim outlook or glimmer of hope? *PLoS Med*. 2007;4(12):1852–7.
91. Kierszenbaum F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitol*. 2007;52(1):1–12.
92. Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(3):287–92.
93. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(6):753–70.
94. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.

95. Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease: one Mechanism or Many? Chicago: Curr Mol Med. 2008.
96. Borodzicz S, Czarzasta K, Kuch M, Cudnoch-Jedrzejewska A. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Lipids Health Dis* [Internet]. 2015;14(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-015-0053-y>
97. Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2008;1781(9):424–34.
98. Paugh SW, Paugh BS, Rahmani M, Kapitonov D, Almenara JA, Kordula T, et al. A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood*. 2008;112(4):1382–91.
99. Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, Saddoughi SA, Sentelle D, Selvam SP, et al. Sphingolipids and cancer: Ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Futur Oncol*. 2010;6(10):1603–24.
100. Dhama R, He X, Schuchman EH. Cellular Physiology and Biochemistry Acid Sphingomyelinase Deficiency Attenuates Bleomycin-Induced Lung Inflammation and Fibrosis in Mice. 2010;10029.
101. Zhao J, Okamoto Y, Asano Y, Ishimaru K, Aki S, Yoshioka K, et al. facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages. 2018;1–22.
102. Tgr T. TGR5 activation suppressed S1P/S1P2 signaling and resisted high glucose-induced fibrosis in glomerular mesangial cells. *Pharmacol Res* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.035>
103. Zhao J. Mesangial Cells and Renal Fibrosis [Internet]. Springer Singapore; 165–194 p. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_9)
104. Lan T, Shen X, Liu P, Liu W, Xu S, Xie X, et al. Berberine ameliorates renal injury in diabetic C57BL / 6 mice : Involvement of suppression of SphK – S1P signaling pathway. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2010;502(2):112–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.07.012>
105. Yoshimatsu Y, Watabe T. Roles of TGF-  $\beta$  Signals in Endothelial-Mesenchymal Transition during Cardiac Fibrosis. 2011;2011.
106. Vasconcelos JF, Meira CS, Silva DN, Nonaka CKV, Daltro PS, MacAmbira SG, et al. Therapeutic effects of sphingosine kinase inhibitor N,N-dimethylsphingosine (DMS) in experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14.
107. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Poli-de-Figueiredo LF. The fundamentals of

- experiments with animals - Applications in experimental surgery. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(1):103–11.
108. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.* 2011;241(1):260–8.
  109. Park S, Im D. Deficiency of Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 (S1P2) Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. 2019;27(3):318–26.
  110. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Inhibition of sphingosine 1-phosphate receptor 2 protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(2):266–80.
  111. Koch A, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine 1-phosphate in renal diseases. *Cell Physiol Biochem.* 2013;31(6):745–60.