

# **AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DO RECEPTOR S1P2 DA ESFINGOSINA 1 FOSFATO (S1P) NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EXPERIMENTAL: EFEITOS NA INFLAMAÇÃO CARDÍACA**

Paula Regina Kathlyn de Abreu<sup>1</sup>  
Juliana Fraga Vasconcelos<sup>2</sup>

## **INTRODUÇÃO**

Os esfingolipídios são moléculas de lipídios essenciais da membrana plasmática e se encontram concentrados em regiões da membrana plasmática ricas em colesterol. Estes lipídios podem ser rapidamente metabolizados, quando estimulados através da ativação de uma cascata enzimática (RIVERA et al., 2008). Dentre os esfingolipídios, destaca-se a esfingosina-1-fosfato (S1P), molécula sinalizatória de natureza anfipática derivada da membrana plasmática de células eucarióticas que regula múltiplos processos fisiológicos em humanos como proliferação celular e quimiotaxia, sendo também implicada na manutenção da resposta inflamatória (TAKABE et al., 2008; LINGWOOD et al., 2010; FYRST & SABA, 2010). Dados da literatura mostram ainda que a S1P apresenta um papel importante também no desenvolvimento durante a angiogênese, cardiogênese, neurogênese e no desenvolvimento límbico (MENDELSON et al., 2013).

Acredita-se que todas as células sejam capazes de gerar S1P como um metabólito intermediário do metabolismo de esfingolipídios (HANNUN & OBEID, 2008). Para exercer seus efeitos, a s1p se liga a um dos cinco tipos distintos de receptores acoplados a proteína G, S1P<sub>1-5</sub> (YESTER et al., 2011).

Dentre os cinco receptores, o S1P1 é o mais amplamente estudado, no entanto os outros receptores também apresentam diversas atividades quando estimulados. Assim como S1P1, S1P2 é altamente conservado entre as espécies e se encontra presente em diversos tecidos (CHUN et al., 2010; KIHARA et al., 2014). S1P2 é capaz de interagir tanto com Gi/0 quanto com Gs, Gq, G12/13, entretanto, interage de forma mais eficiente com a proteína G12/13. Camundongos knockouts para o gene S1pr2 apresentam defeitos graves no ouvido interno, que leva à surdez e a problemas de equilíbrio (KONO et al., 2007). S1P2 apresenta também papel na integridade vascular com efeito contrário ao do S1P1. Em modelo de injúria pulmonar aguda, a deleção de S1P2 reduz o edema e o mesmo efeito pode ser observado quando o receptor S1P1 é ativado com agonista específico (SAMMANI et al., 2010). Além disso, a indução da expressão de S1P2 por TNF induz a expressão de ICAM-1 e VCAM-1, indicando papel de S1P2 como regulador da ativação do endotélio (ZHANG et al., 2013). O S1P2 também foi implicado na regeneração muscular, ao ativar vias de sinalização que culminam com o crescimento de células satélites (LOH et al., 2012).

Dessa forma, não há consenso no papel da via s1p – S1P2, em relação a sua ação protetora ou deletéria e em especial, não há estudos na doença de chagas. O tratamento na cardiopatia chagásica crônica experimental com DMS, inibidor da enzima responsável na fosforilação da esfingosina em S1P, apresentou efeitos antiinflamatórios e anti-fibróticos

<sup>1</sup>Graduando do Curso de Enfermagem da Universidade Salvador - UNIFACS, [abreuprk@gmail.com](mailto:abreuprk@gmail.com);

<sup>2</sup>Professor orientador: Doutora, Universidade Estadual de Feira de Santana - BA, [julianafvs@gmail.com](mailto:julianafvs@gmail.com).

(VASCONCELOS., et al., 2017). Apesar dos efeitos benéficos do uso do DMS, foi observada ativação de outras vias intracelulares que podem ser potencialmente deletérias às células, sendo importante a investigação de outras formas que bloqueiem a ação do S1P, como por exemplo a utilização de antagonistas do receptor S1P2, o JTE013. Dessa maneira, propomos o tratamento de camundongos chagásicos crônicos com o antagonista do S1P2 a fim de avaliar se a imunomodulação por esses agentes é capaz de reduzir o infiltrado inflamatório no coração e a fibrose cardíaca, promovendo melhora funcional nos animais.

## **METODOLOGIA (OU MATERIAIS E MÉTODOS)**

Os animais utilizados foram camundongos machos da linhagem *C57BL/6*, com idade entre 6 e 8 semanas, serão utilizados em todos os experimentos. Todos os animais serão mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular – Hospital São Rafael, tendo a disposição água e alimentação ad libitum. Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal (CEUA/HSR), sob número 05/17.

Os camundongos serão infectados através da inoculação de  $10^2$  tripomastigotas de *T. cruzi*, por via intraperitoneal. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana serão obtidas do sobrenadante da cultura de células de rim de macaco (*LLC-MK2*) infectadas. A parasitemia será acompanhada através da contagem do número de tripomastigotas em alíquotas do sangue periférico, em vários tempos pós-infecção.

Animais chagásicos crônicos serão divididos em três grupos: (a) Animais chagásicos crônicos tratados com JTE013 (1 mg/Kg), (b) Animais chagásicos crônicos tratados apenas com o veículo por igual período de tempo. Camundongos não infectados serão utilizados como controle (c).

A análise funcional será realizada através de registros eletrocardiográficos obtidos nos camundongos controles e nos chagásicos crônicos infectados antes e após o tratamento, na derivação bipolar DI. Os registros eletrocardiográficos serão realizados usando o equipamento *Bio Amp PowerLab (PowerLab 2/20; ADInstruments, Castle Hill, Austrália)* que permite o registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os registros serão obtidos após a indução de anestesia geral nos animais. Todos os dados serão adquiridos e armazenados em computador para posterior análise com a ajuda do programa *Chart 5 for Windows (PowerLab; ADInstruments, Castle Hill, Austrália)*.

Os animais serão eutanaziados em câmara de CO<sub>2</sub> após o tratamento. Metade dos corações será fixada em formalina 4%, para realização de cortes e preparação de lâminas. As lâminas serão analisadas por microscopia de campo claro após terem sido coradas com hematoxilina-eosina. As imagens serão digitalizadas usando uma câmera digital *CoolSnap* adaptada ao microscópio AX-70 (*Olympus*) e analisadas usando o programa *Image Pro Plus* versão 5.0 (*Media Cybernetics*), permitindo a contagem das células do infiltrado inflamatório em dez campos por corte de coração integradas por área. O percentual de fibrose será determinado usando o mesmo programa, integrando as áreas de tecido fibrótico e não-fibrótico em cada campo, em cortes de coração corados com picrossírius vermelho.

Os dados serão analisados usando o teste ANOVA ou teste de comparação múltipla *Newman-Keuls multiple*, com o programa *Prism* versão 3.0 (*Graph Pad Software*). Os valores de todas as variáveis deverão ser expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças serão consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## **DESENVOLVIMENTO**

A Organização Mundial de saúde (OMS) estima que existam, aproximadamente, de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pela doença de Chagas em todo mundo. Desse número, 5.742.167 infectados estão espalhados por 21 países da América Latina e, 1.156.821 de portadores são procedentes do Brasil (II CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2015). Os dados epidemiológicos são significativos dado o histórico da doença, através deles é possível perceber a distribuição espacial que é limitada primariamente ao continente americano, por isso a doença também pode ser denominada “tripanossomíase americana” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A epidemiologia também se torna importante e comprobatória porque demonstra presença da doença em destaque do Brasil, mesmo depois de cem anos de descoberta, e retrata em números a necessidade de busca a novas abordagens para o tratamento dos pacientes diagnosticados.

A doença de Chagas foi descrita pela primeira vez em 1909, pelo então Dr. Carlos Chagas, que anunciou para a comunidade científica a presença do protozoário *Trypanosoma cruzi* em humanos (CALDAS, 2008). Ela representa uma condição infecciosa (com fase aguda ou crônica) e é classificada como enfermidade negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). No Brasil, atualmente, predominam os casos em fases crônicas decorrentes da infecção por via vetorial em décadas passadas (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2015). A fase crônica tem seu início com uma forma indeterminada (assintomática) na qual pouco se conhece quanto aos mecanismos que levam à evolução para as formas sintomáticas, no entanto, alguns pacientes evoluem para presença de sintomas que afetam diretamente o coração, esôfago, colón e outros tecidos (COSTA, 2012).

De maneira geral, após a infecção pelo *T. cruzi* em humanos, há o desenvolvimento da fase aguda da doença, muitas vezes subclínica, que é transitória e caracterizada por parasitemia patente. A estimulação da resposta imune é crucial para a redução da carga parasitária, entretanto, pode contribuir para o agravamento dos sintomas clínicos. Na forma indeterminada da fase crônica, há a formação de um ambiente regulador que proporciona o equilíbrio dinâmico entre a resposta inflamatória protetora e o parasito de maneira a restringir a lesão tecidual e, portanto, nesses pacientes há uma ausência de manifestações clínicas relevantes (DIAS & COURA, 1997). Os indivíduos infectados evoluem, em cerca de 30% dos casos, para uma forma crônica sintomática, que apresenta sintomas cardíacos e/ou digestivos, em decorrência do processo inflamatório caracterizado pela presença de infiltrado celular mononuclear, promovendo destruição tecidual pela persistência do agente nocivo, das células inflamatórias ou ambos (SOARES et al., 2001; DUTRA, ROCHA & TEIXEIRA, 2005).

O acometimento cardíaco, em graus clínicos variados, causa a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), principal causa de morte em indivíduos chagásicos. A CCC é caracterizada por uma resposta inflamatória intensa e destruição progressiva do tecido cardíaco, causando anormalidades da condução cardíaca e arritmias (MACAMBIRA et al., 2009). Apesar dos fármacos utilizados para o tratamento (Nifurtimox e Benznidazol) terem uma alta eficácia de cura quando utilizados na fase aguda da doença, tem um papel protetor menos relevante na fase crônica da doença. Dessa forma, os pacientes crônicos realizam tratamentos que tem o objetivo de reduzir a evolução da insuficiência cardíaca causada pela ação do protozoário e da resposta inflamatória do hospedeiro, fazendo uso de terapias farmacológicas anti-hipertensivas, por exemplo (COSTA, 2012). Muitos pacientes progridem para a necessidade de implante de marca-passo ou até mesmo para transplante cardíaco, procedimento de difícil acesso e extremamente complexo na população de pacientes chagásicos. Devido à pouca eficiência dos tratamentos etiológicos contra o *T. cruzi* na atualidade, em particular, na fase crônica da doença, é conhecida a importância de novas

estratégias para reduzir a resposta inflamatória visando diminuir os danos da cardiopatia chagásica.

Como objetivo geral, buscou-se investigar o efeito da inibição da atividade da S1P, via receptor S1P<sub>2</sub>, através do bloqueio farmacológico com JTE013, antagonista desse receptor, na cardiopatia chagásica crônica em modelo experimental de camundongos cronicamente infectados por *Trypanosoma cruzi* da cepa Colombiana.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os esfingolipídios, em particular o S1P, podem ser encontrados em tecidos linfóides, sangue (ligados a albumina, a HDL ou não ligados a outras moléculas) e linfa. A regulação da resposta imune, bem como o recrutamento celular e a permeabilidade vascular são influenciados pelas concentrações de S1P e a expressão de seus receptores influencia a ação desempenhada. Como discutido por RIVERA et al (2008), o receptor S1P<sub>1</sub> é encontrado em todas as células do sistema imune, enquanto que o receptor S1P<sub>2</sub> é expresso, principalmente, em células da imunidade inata (as células que expressam S1P<sub>2</sub> são: células dendríticas, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e NKT – Células T Natural Killer) (RIVERA et al., 2008).

Na fase cardíaca da doença de chagas, observa-se a regulação imunológica coordenada pelo aumento na produção das citocinas inflamatórias, TNF-alfa e INF-gama, especialmente deflagrados por linfócitos T CD4 e T CD8 (DUTRA et al, 2014). Entre as células mononucleares, os monócitos são os principais responsáveis pela produção de TNF-alfa, enquanto que os linfócitos T DC4 são os maiores produtores de INF-gama (DUTRA et al, 2014). À medida que o S1P<sub>2</sub> foi antagonizado pelo JTE013, justifica-se a redução da inflamação pois existe menos células inflamatórias migrando para o ambiente cardíaco.

Já os cardiomiócitos expressam os receptores de S1P, S1P<sub>1-3</sub>, sendo S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> os que apresentam maior atividade na regulação da fisiologia cardíaca (LI and ZHANG, 2016). A expressão de S1P<sub>2</sub> é baixa nos cardiomiócitos (LANDEEN et al 2008; ZHANG et al 2007). E apesar da redução da inflamação, não foi observada redução do percentual de fibrose nos animais tratados quando comparados aos animais controles. A redução da via S1P-S1P<sub>2</sub> deve ter contribuído para aumentar a ativação da via da S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>, em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, culminando no aumento da deposição de colágeno intersticial.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após análise histológica, observou-se a diminuição da contagem de células inflamatórias nos grupos experimentais tratados com JTE 013 em comparação ao grupo não tratado. Quanto ao perfil de fibrose, os dados variaram. No grupo tratado com o FTY 7 houve maior efetividade na diminuição de fibrose tecidual em comparação com os achados encontrados no grupo de animais tratados com JTE não demonstraram diferença estatística, assemelhando-se o resultado com o grupo de animais Não Tratados.

**Palavras-chave:** Cardiopatia Chagásica Crônica, JTE, Sphingosine-1-phosphate

## REFERÊNCIAS

- LI, Ningjun and ZHANG, Fan. Implication of sphingosin-1-phosphate in cardiovascular regulation. **Front Biosci** (Landmark Ed). Author manuscript; available in PMC 2016 June 01.
- RIVERA, Juan; PROIA, Richard L.; OLIVERA, Ana. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. **Nature Reviews: immunology**. V. 8, p. 753-763. Oct, 2008.
- DUTRA, Walderez O.; MENEZES, Cristiane A.S.; MAGALHÃES, Luisa M.; GOLLOB, Dand Kenneth J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**. Aug, 2014; 36(8): 377–387. doi:10.1111/pim.12107.
- MORIYAMA, Saya; TAKAHASHI, Noriko; GREEN, Jesse A.; HORI, Shohei; KUBO, Masato; CYSTER, Jason G.; OKADA, Takaharu. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. The Rockefeller University. **J. Exp. Med**. 2014 Vol. 211 No. 7 [1297-1305www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20131666](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20131666)
- WANG, E.; HE, X.; ZENG, M.. The Role of SIP and the Related Signaling Pathway in the Development of Tissue Fibrosis. **Front. Pharmacol.**, 08 January 2019, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01504> [Erjin](http://Erjin)
- KACIMI et al. Adult cardiac fibroblasts null for sphingosine kinase-1 exhibit growth dysregulation and an enhanced proinflammatory response. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 43 (2007) 85–91.
- Landeen, L. K., Aroonsakool, N., Haga, J. H., Hu, B. S., and Giles, W. R. (2007). Sphingosine-1-phosphate receptor expression in cardiac fibroblasts is modulated by in vitro culture conditions. **Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.** 292, H2698. doi: 10.1152/ajpheart.01065.2006
- Landeen, L. K., Dederko, D. A., Kondo, C. S., Hu, B. S., Aroonsakool, N., Haga, J. H., et al. (2008). Mechanisms of the negative inotropic effects of sphingosine-1-phosphate on adult mouse ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.** 294, H736–H749. doi: 10.1152/ajpheart.00316.2007
- Zhang, J., Honbo, N., Goetzl, E. J., Chatterjee, K., Karliner, J. S., and Gray, M. O. (2007). Signals from type 1 sphingosine-1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia. **Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.** 293, H3150–H3158. doi: 10.1152/ajpheart.00587.2006.