

LUCAS VELLASCO DE MATTOS

**Papel dos mastócitos na neovascularização inflamatória em  
modelo de infecção da bolsa jugal do hamster pelo**

*Trypanosoma cruzi*

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

RIO DE JANEIRO

2019

## RESUMO

DE MATTOS, Lucas Vellasco. **Papel dos mastócitos na neovascularização inflamatória em modelo de infecção da bolsa jugal do hamster pelo *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro, 2019. TESE (Doutorado em Imunologia e Inflamação – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019).

O extravasamento de plasma induzido por fatores pró-angiogênicos possibilita a formação de uma matriz provisória de fibrina que dá suporte a migração de células endoteliais ativadas durante o processo de neovascularização. Células da imunidade inata como macrófagos e mastócitos liberam fatores pró-angiogênicos, como IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 and VEGF em resposta a diversos estímulos. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o extravasamento de plasma, propagado por mastócitos através de um eixo que envolve a ativação da via de contato e liberação de bradicinina, estimula o parasitismo, a miocardite e a deposição de colágeno. Neste trabalho, foi investigado o impacto do parasitismo na bolsa jugal do hamster (BJH) após a inoculação de tripomastigotas da cepa Dm28c expressando a proteína GFP (TCT-GFP). Um método computacional foi desenvolvido para quantificar parâmetros angiogênicos (área vascular – AV, comprimento vascular total - CVT e número de segmentos de vasos – NS) e inflamatórios (unidades relativas de fluorescência – URF e fluorescência não vascular – FNV). As imagens de microscopia intravital mostraram angiogênese na BJH em 7 dias após a inoculação de 10<sup>6</sup> TCT-GFP. A neovascularização foi associada a infiltrado inflamatório e aumento da densidade de macrófagos CD68<sup>+</sup> e mastócitos, além da produção de IL-1 $\beta$ . A relação entre o parasitismo e a angiogênese foi embasada por: i) ausência de inflamação e angiogênese em resposta a injeção de epimastigotas (forma parasitária não infectiva) da cepa Dm28c e ii) inibição da neovascularização inflamatória após o tratamento com benznidazol (um antiparasitário), iniciado 24 horas pós-infecção. O tratamento com benznidazol inibiu também a produção de IL-1 $\beta$  em resposta a infecção. Com o objetivo de saber a distribuição dos parasitas após a inoculação na BJH, inoculamos 10<sup>6</sup> TCT-GFP em conjunto com 10<sup>6</sup> TCT expressando a enzima luciferase. A injeção intravenosa com D-luciferina mostrou a distribuição dos parasitas na BJH em 7, 14 e 21 dpi, assim como nas glândulas salivares e na gordura anexa ao tecido. Análises moleculares mostraram a presença de parasitas no coração dos hamster em 7, 14, 21 e 30 dpi. A BJH foi examinada em 3 dpi, quando a neovascularização é ainda incipiente, com o objetivo de descobrir o perfil inflamatório e os fatores pró-angiogênicos

produzidos em resposta a infecção. O aumento nas URF e FNV indica que, em 3 dpi, a barreira endotelial encontra-se desestabilizada o que resulta em aumento da permeabilidade vascular. Análises por PCR quantitativo mostraram correlação positiva entre a expressão gênica de citocinas (pró-IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) e parâmetros angiogênicos (NS e CVT) em 3 dpi. A produção de IL-1 $\beta$ , confirmada por ELISA, foi inibida pelo tratamento com benznidazol (100 mg/kg/dia, oral). Análises proteômicas em 3 dpi mostraram aumento na expressão da quimase, uma protease de mastócitos, também inibido pelo tratamento com benznidazol. A quimase é uma protease liberada por mastócitos em eventos de degranulação, a qual teve efeitos pró-angiogênicos mostrados em modelo utilizando o hamster sírio. Além de degradar a matriz extracelular, liberando fatores angiogênicos, a quimase converte angiotensina I em angiotensina II, peptídeo que induz a produção de VEGF por fibroblastos. Os hamster foram tratados com inibidores da quimase (quimostatina e TY-51469) e da enzima conversora de angiotensina (captopril). Esses inibidores de proteases reduziram significativamente os parâmetros de angiogênese e inflamação, aumentados em resposta a infecção. Apesar da redução de FNV e CVT, o tratamento dos hamster com cromoglicato (um inibidor da degranulação de mastócitos) não inibiu a angiogênese de forma semelhante aos outros tratamentos. Em conjunto, os dados sugerem a importância da quimase, uma protease de mastócitos, na neovascularização inflamatória em resposta a infecção por *T.cruzi*.

Descritores: angiogênese, inflamação, mastócitos, *Trypanosoma cruzi*, quimase.

## ABSTRACT

DE MATTOS, Lucas Vellasco. **The role of mast cells in the inflammatory neovascularization in the *Trypanosoma cruzi* infected hamster cheek pouch.** Rio de Janeiro, 2019. TESE (Doutorado em Imunologia e Inflamação – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Microvascular leakage induced by proangiogenic factors fosters the formation of a provisional fibrin matrix that supports the migration of endothelial-*tip cells* at the onset of neovascularization. Innate immunity cells, such as macrophages and mast cells, release proangiogenic factors, such as IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 and VEGF, in response to diverse stimuli. We reported that plasma leakage, a mast cell (MC)--driven inflammatory response propagated via cycles of bradykinin release and contact system activation, fuels heart parasitism, myocarditis and collagen deposition. Here we investigated the impact of tissue parasitism in the microcirculation of the hamster cheek pouch (HCP) following challenge by Dm28c tissue culture trypomastigotes (TCT) expressing GFP protein. A previously developed computer based method allowed the analysis of intravital microscopy images and quantification of different angiogenesis (number of segments – NS, total vascular length – TVL and vascular area – VA) and inflammation parameters (non vascular fluorescence - NVF and relative fluorescence units – RFU). Intravital microscopy (IVM) showed angiogenesis in HCP at 7 dpi in comparison to PBS injected controls and contralateral tissues.. Neovascularization was associated to inflammatory infiltrate, increased density of MCs, increased number and percentage of CD68<sup>+</sup> macrophages and also IL-1 $\beta$  production. The link between parasitism and angiogenesis was supported by evidences that (i) injection of the same dose of Dm28c epimastigotes did not induce changes of angiogenesis indices in the HCP (ii) Benznidazole (BZN) treatment initiated 24 h after TCT inoculation abrogated inflammatory neovascularization at 7 dpi. Benznidazole treatment also inhibited IL-1 $\beta$  production. In attempt to know the distribution of parasites within different organs, hamsters were inoculated with TCT-GFP and TCT Dm28c expressing luciferase. Hamsters were systemically injected (i.v) with D-luciferin and bioluminescence revealed the distribution of TCT-GFPs in the infected HCPs and parasitism in salivary glands and also hamster cheek pouch fat on 7, 14 and 21 dpi. Molecular analysis demonstrated parasite load in the heart on 7, 14 and 21 dpi. We examined the HCP on 3 dpi, when neovascularization is still incipient, in order to know the inflammatory

profile and proangiogenic factors produced in response to infection. Relative fluorescence units and non-vascular fluorescence (dextran-FITC) were slightly increased, suggesting that endothelial barrier function is altered on 3 dpi. Quantitative PCR analysis revealed a positive correlation between pro-IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  expression and angiogenesis parameters (NS and TVL) on 3 dpi. IL-1 $\beta$  production was confirmed by ELISA and benznidazole treatment reduced the concentration of this cytokine in HCP homogenates at this time point. Next, we conducted proteomic analysis in infected HCP (3 dpi) versus infected/BZN-treated hamsters and found upregulated levels of chymase, a MC protease, previously appointed as a driver of angiotensin II-dependent angiogenesis in the hamster sponge model. *T.cruzi*-induced angiogenesis was blocked by an angiotensin II converting enzyme inhibitor (captopril – 10 mg/kg/day, ip), chymostatin (2 mg/kg/day, ip) and TY51469 (10 mg/kg/day, ip), a selective chymase inhibitor. Although cromoglicate (40 mg/kg/day, ip) treatment demonstrated an anti-inflammatory effect, reducing NVF and RFU, this drug was less effective in inhibiting neovascularization. These data suggest the importance of mast cell chymase for inflammatory neovascularization in the TCT-GFP infected HCP.

Key Words: mast cell, inflammation, angiogenesis, *Trypanosoma cruzi*, chymase.