

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES
VASCULARES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA
COLOMBIANA DE *TRYPANOSSOMA CRUZI***

Flávia Souza Coelho

**Belo Horizonte
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Flávia Souza Coelho

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES
VASCULARES EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA
COLOMBIANA DE *Trypanossoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: **Prof^a. Dra. Virgínia Soares Lemos**

**Belo Horizonte
2014**

043

Coelho, Flávia Souza.

Avaliação dos mecanismos envolvidos nas alterações vasculares em camundongos infectados pela cepa colombiana de trypanossoma cruzi [manuscrito] / Flávia Souza Coelho. - 2014.

56 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Virgínia Soares Lemos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Chagas, Doença de - Teses. 2. Tripanossoma cruzi - Teses. 3. Disfunção endotelial. 4. Fisiologia - Teses. I. Lemos, Virgínia Soares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, amor maior da minha vida, meus exemplos! Sem o apoio, amor e dedicação de vocês nunca teria ido tão longe. E a Deus que sempre me ilumina, me guia e protege.

Aos meus irmãos João e Débora pelo amor, amizade e apoio.

Ao Léo, obrigada pelo amor, paciência, conselhos e por tentar entender tantos momentos de estresse.

A Rosária, pessoa que foi fundamental nessa etapa da minha vida. Obrigada por ter me apresentado a nossa orientadora, por ter me incentivado. Obrigada por ter me ensinado tanto. Tenho muito orgulho de você.

Aos meus amigos, sinceros e sempre presentes, obrigada por entenderem minha ausência e pelo incentivo constante.

Aos meus familiares, que são também amigos. Primos e primas, tios e tias que são uma verdadeira benção em minha vida. A amizade de vocês me manteve firme.

A minha orientadora Virgínia pela oportunidade, por toda a paciência e respeito com o qual me orientou. Por ser uma orientadora tão presente e disposta. Você é um exemplo profissional para minha vida.

Aos professores Luciano, Steyner, Policarpo e Jader pela contribuição direta em todas as etapas desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de fisiologia e farmacologia cardiovascular, obrigada pela ótima convivência nesses mais de 2 anos. Por toda a ajuda e ensinamentos. Por todas as risadas e conselhos nos momentos de desabafo. Não podia deixar de agradecer em especial a Joseane, pessoa paciente, respeitosa e que foi primordial nos experimentos e discussões.

E a Betinha, por alegrar nossas manhãs e ser sempre tão disposta a ajudar.

A todos os funcionários e demais professores da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia que tive a oportunidade de conhecer.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A infecção pelo *Trypanosoma Cruzi* causa a Doença de Chagas. A patologia resulta em miocardite aguda e cardiomiopatia crônica, ambas, associadas à lesão microvascular. Embora a disfunção vascular esteja presente nos vasos da microvasculatura cardíaca, pouco ou quase nada se sabe sobre os mecanismos envolvidos nesta disfunção em outros leitos vasculares. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a cepa colombiana do *T. Cruzi* afeta, direta ou indiretamente, a função vascular sistêmica. Foram utilizados camundongos C57BL6 machos com 8 semanas de vida, infectados com a cepa colombiana do *T. Cruzi*. Os animais foram utilizados para realização dos experimentos 30 dias após a infecção. Experimentos de imunofluorescência mostraram a presença do antígeno TcRBP28 da cepa colombiana do *T. Cruzi*, na camada endotelial da aorta dos animais infectados. Quanto à resposta vascular foi observado na aorta dos animais com Chagas, uma diminuição na resposta vasorelaxante acompanhada de diminuição da expressão da eNOS total, uma redução na fosforilação do sítio de ativação da enzima (eNOS Ser¹¹⁷⁷), concomitante a um aumento de fosforilação no sítio de inativação (eNOSThr⁴⁹⁵). No entanto, a produção basal de NO estava muito aumentada, bem como a expressão da iNOS. Também foi observado um aumento na resposta contrátil nos anéis da aorta dos animais infectados. O aumento de contração não foi revertido pelo bosentano, antagonista dos receptores de ET-1. O ibuprofeno, inibidor não seletivo da COX, o SQ28668, antagonista dos receptores do TXA₂ e a remoção do endotélio, normalizaram a resposta contrátil dos animais infectados, indicando que o TXA₂ está envolvido no aumento de contração. Os nossos dados de microscopia de fluorescência mostraram um aumento na produção de superóxido e da expressão de nitrotirosina. O tiron, sequestrador de superóxido e a SOD, enzima que degrada superóxido, também normalizaram a resposta contrátil dos animais infectados. O TNF- α , estava bastante aumentado no soro dos animais infectados, sugerindo a existência de inflamação sistêmica. O conjunto dos nossos resultados nos permite concluir que a presença do parasita nas células endoteliais da aorta de camundongos e a inflamação sistêmica, causaram uma disfunção vascular, provavelmente, por uma diminuição da expressão e do funcionamento da eNOS e pelo aumento da expressão da iNOS. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são formadas instalando um quadro de estresse oxidativo, que associado ao aumento dos níveis de TXA₂ causa aumento da resposta contrátil.

ABSTRACT

The infection by *Trypanosoma Cruzi* causes Chagas disease. The disease results in acute myocarditis and chronic cardiomyopathy, both associated with microvascular injury. Although vascular dysfunction is present in the vessels of the cardiac microvasculature, little or nothing is known about the underlying mechanism of this dysfunction in other vascular beds. The aim of this study was to evaluate whether the Colombian strain of *T. Cruzi* affects, directly or indirectly, systemic vascular function. Eight weeks old C57BL6 male mice were infected with the Colombian strain of *T. Cruzi*. The animals were used for the experiments 30 days after infection. Immunofluorescence experiments showed the presence of the antigen TcRBP28, of the Colombian strain of *T. Cruzi*, in the endothelial layer of the aorta of infected animals. Regarding the vascular response was observed in aorta of infected animals, a decrease in the vasorelaxant response accompanied by decreased expression of total eNOS, a reduction in phosphorylation of the activation site of the enzyme (eNOS Ser¹¹⁷⁷), concomitant with an increase in phosphorylation of inactivation site (eNOSThr⁴⁹⁵). However, the basal NO production was markedly increased in infected animals, as well as the expression of iNOS. There was also an increase in contractile response in aortic rings from infected animals. The increased contraction was not reversed by bosentan antagonist of ET-1 receptors. Ibuprofen, a non-selective COX inhibitor, SQ28668, a TXA₂ receptor antagonist and removal of the endothelium normalized the contractile response of infected animals, indicating that TXA₂ is involved in the increase in contraction. Our data of fluorescence microscopy showed an increase in superoxide production and increased expression of nitrotyrosine. Tiron, a scavenger of superoxide and SOD, an enzyme that degrades superoxide, also normalized the contractile response of infected animals. TNF- α , was greatly increased in the serum of infected animals, suggesting the existence of systemic inflammation. Together our results, allows us to conclude that the presence of the parasite in aortic endothelial cells of mice and systemic inflammation, cause a vascular dysfunction, probably by a decreased expression and function of eNOS and by increasing iNOS expression. Reactive species of oxygen and nitrogen are formed installing a frame of oxidative stress, which associated with increased levels of TXA₂ causes increased contractile response.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS	V
1 - Introdução	01
1.1 - Aspectos gerais e epidemiológicos da Doença de Chagas	02
1.2 - Infecção pelo <i>Trypanosoma Cruzi</i> e sistema cardiovascular	07
1.2.1- Aspectos moleculares e imunológicos	08
1.2.2- Tecido cardíaco	11
1.2.3- Microvasculatura cardíaca	12
2 - Objetivos	14
2.1 – Objetivo Geral	15
2.2 – Objetivos Específicos	15
3 – Materiais e métodos	16
3.1 - Animais experimentais	17
3.1.1 - Infecção dos animais	17
3.2 – Protocolos Experimentais	17
3.2.1 – Imunofluorescência	18
3.2.2 – Experimentos de reatividade vascular	19
3.2.2.1 – Montagem dos anéis de aorta	19
3.2.2.2 – Avaliação da integridade do endotélio	20

3.2.2.3 – Remoção do endotélio	20
3.2.2.4 – Avaliação da resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina	20
3.2.2.5 – Avaliação da resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina	21
3.2.3 – Western-blot	21
3.2.3.1 - Determinação da expressão protéica da eNOS e da iNOS por Western blot	21
3.2.3.2 - Determinação da funcionalidade da eNOS por análise do grau de fosforilação em resíduos de serina e treonina, por Western blot	23
3.2.4 – Dosagem de óxido nítrico e superóxido por microscopia de fluorescência	24
3.2.5 - Quantificação de Citocina no Soro por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	25
3.3 - Análises estatísticas e expressão dos resultados	25
4 – Resultados	27
4.1 – Avaliação da presença do parasita na aorta	28
4.2 – Avaliação da resposta vascular	28
4.3 – Avaliação dos mecanismos envolvidos na alteração da resposta vascular	29
4.3.1 – Avaliação do papel das NOS na diminuição do relaxamento vascular	29

4.3.2 – Avaliação do papel das NOS no aumento da resposta contrátil	31
4.3.3 – Participação da Endotelina-1 e do Tromboxano A ₂ no aumento da resposta contrátil dos animais infectados	36
4.3.4 – Estresse oxidativo e aumento da contratilidade vascular	37
5 – Discussão	41
5- Discussão	42
6 – Conclusão	48
6- Conclusão	49
7- Referências Bibliográficas	50
7- Referências Bibliográficas	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo3

Figura 2: Ciclo de transmissão do *Trypanosoma Cruzi*4

Figura 3: Imunofluorescência mostrando a localização do antígeno TcRBP28 (encontrado na cepa colombiana do *T. cruzi*) na camada endotelial da aorta de camundongos controles e infectados com o *T. cruzi* por 30 dias. Verde: autofluorescência das fibras elásticas; vermelho: antígeno TcRBP28; azul: núcleos marcados pela sonda DAPI28

Figura 4: (A) Resposta vasorrelaxante induzida pela acetilcolina em aorta contendo endotélio funcional de camundongos controle (n=4) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=11). (B) Curva concentração-resposta em resposta a fenilefrina em aortas contendo endotélio funcional de camundongos controle (n=20) e infectados (n=21). Two-way ANOVA. ***p<0,001.....29

Figura 5: (A) Resposta vasorrelaxante induzida pela acetilcolina em aorta de camundongos controle (n=5) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=5) contendo endotélio funcional, na presença ou ausência do inibidor não seletivo das NOS (L-NAME 300 µM). Two-way ANOVA. ***p<0,001. (B) Área sobre a curva do efeito da acetilcolina na aorta dos animais controle e chagásico na presença ou ausência de L-NAME (300µM). (C) Delta da área sobre a curva na aorta dos animais controle e

chagásico na presença ou ausência de L-NAME (300µM). Teste t de *Student*.

***p<0,00130

Figura 6: Análise da expressão proteica por Western blot da eNOS total (A), sítio de ativação da eNOS, Ser1177 (B), sítio de inativação da eNOS, Thr495 (C). O histograma representa a média ± EPM destes experimentos. Os resultados foram normalizados pelo GAPDH ou eNOS total das amostras. Teste t de *Student*.

***p<0,00131

Figura 7: (A) Resposta contrátil induzida pela fenilefrina nos vasos desprovidos de endotélio funcional em aorta de camundongos controle (n=6) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=9) e (B) Resposta contrátil dos vasos contendo endotélio funcional, na presença ou ausência do inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases (L-NAME; 300 µmol/L) em camundongos controle (n=4) e infectados (n=7). Two-way ANOVA.

***p<0,00132

Figura 8: Resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta de camundongos na presença do inibidor (L-NNA 1 µmol/L) em camundongos controle (n=4) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=4). Two-way ANOVA. ***p<0,00133

Figura 9: Resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta de camundongos na presença do inibidor seletivo da iNOS (L-NIL; 10 µM) em camundongos controle (n=5) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=4). Two-way ANOVA. ***p<0,001

Figura 10: Análise da expressão proteica por Western blot da iNOS total em anéis de aorta com endotélio funcional intacto. O histograma representa a média \pm EPM destes experimentos. Os resultados foram normalizados pela β -actina. Teste t de *Student*. *** $p < 0,001$ 34

Figura 11: Intensidade de fluorescência na presença de sonda DAF-FM, para NO em animais controle e infectados pelo *T. Cruzi*, na presença ou ausência do inibidor seletivo da iNOS, L-NIL. Teste t de *Student*. *** $p < 0,001$ 35

Figura 12: Dosagem do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no soro de animais controle (n=8) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=8). Teste t de *Student*. *** $p < 0,001$ 36

Figura 13: Resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença do antagonista dos receptores da ET-1 (bosentano 10 $\mu\text{mol/L}$) em aorta de camundongos controle (n=4) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=8). Two-way ANOVA. *** $p < 0,001$ 37

Figura 14: (A) Resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença do inibidor não seletivo da COX, ibuprofeno (1 $\mu\text{mol/L}$) em aorta de camundongos controle (n=6) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=4). (B) Resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença do antagonista dos receptores de TXA₂, SQ28668 (1

$\mu\text{mol/L}$) em aorta de camundongos controle (n=4) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=4).

Two-way ANOVA. *** $p < 0,001$ 37

Figura 15: (A) Curva concentração-resposta induzida pela fenilefrina na presença ou ausência do tiron ($10 \mu\text{mol/L}$) em aorta de camundongos controle (n=6) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=4). (B) Resposta contrátil induzida pela fenilefrina na presença ou ausência da SOD (300 UI) em aorta de camundongos controle (n=4) e infectados pelo *T. Cruzi* (n=4). Two-way ANOVA. *** $p < 0,001$

.....38

Figura 16: Intensidade de fluorescência na presença de sonda DHE, para O_2^- em animais controle e infectados pelo *T. Cruzi*, na presença ou ausência do sequestrador de anions O_2^- , tiron. Teste t de *Student*. *** $p < 0,001$ 39

Figura 17: Análise da expressão proteica por Western blot de resíduos de nitrotirosina em anéis de aorta contendo endotélio funcional. O gel é representativo de 2 experimentos com resultados similares e o histograma representa a média \pm EPM destes experimentos. Os resultados foram normalizados pela β -actina das amostras. Teste t de *Student*. ** $p < 0,01$ 40

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
COX	Ciclooxigenase
CO ₂	Dióxido de carbono
DAF-FM diacetato	4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína Diacetato
DAPI	4',6'-diamino-2- phenylindole
DHE	Dihidroetídina
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da media
ET-1	Endotelina-1
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCl	Ácido clorídrico
HRP	Peroxidase
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
L-NAME	N ^w -nitro-L-arginina metil éster
L-NIL	L-N ⁶ -(1-Iminoethyl)lysine hydrochlor

L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mmol/L	Concentração milimolar
mN	MiliNewton
mol/L	Concentração molar
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Na ₃ PO ₄	Fosfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde

O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PBS	Solução tamponada de fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
R-R'	Intervalo entre 2 batimentos cardíacos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio (lauryl) sulfato-poliacrilamida
SOD	Enzima superóxido dismutase
SQ28668	Antagonista dos receptores de TXA ₂
<i>T. Cruzi</i>	<i>Trypanosoma Cruzi</i>
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TXA ₂	Tromboxano A ₂
°C	Graus centígrados
%	Porcentagem
μg	Micrograma

μL	Microlitros
μM	Micromolar
$\mu\text{mol/L}$	Concentração micromolar

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Aspectos gerais e epidemiológicos da Doença de Chagas

A infecção pelo protozoário *Trypanosoma Cruzi* causa a Doença de Chagas. Identificada pelo mineiro Carlos Chagas no início do século XX, é transmitida por insetos da família Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros. A patologia resulta em miocardite aguda e cardiomiopatia crônica, ambas associadas à lesão da microvasculatura cardíaca. A taxa de mortalidade e incapacidade nos países onde a doença é endêmica é enorme. Milhões de pessoas infectadas desenvolvem gradualmente a Doença de Chagas sintomática (Huang, 1999; Petkova, 2001; Dias, 2008; Mukherjee, 2004; Hassan, 2006).

A patologia é uma importante causa de morte na América Latina, América Central e devido à migração também no sul dos Estados Unidos (Figura 1). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde - OMS – em 2011 cerca de 18 milhões de pessoas, somente na América Latina, já foram infectadas pelo tripanossomatídeo, sendo que 300 mil novos casos e 21 mil mortes são registrados anualmente. Um dos dados ainda mais preocupante refere-se ao fato de que cerca de 120 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sujeitas diretamente à infecção. Embora programas de controle direto da transmissão do *T. Cruzi* para humanos pela redução da população do vetor venha tendo algum sucesso, as medidas não são efetivas para erradicar a transmissão e contágio pelo *T. Cruzi* (Tanowitz, 1992).

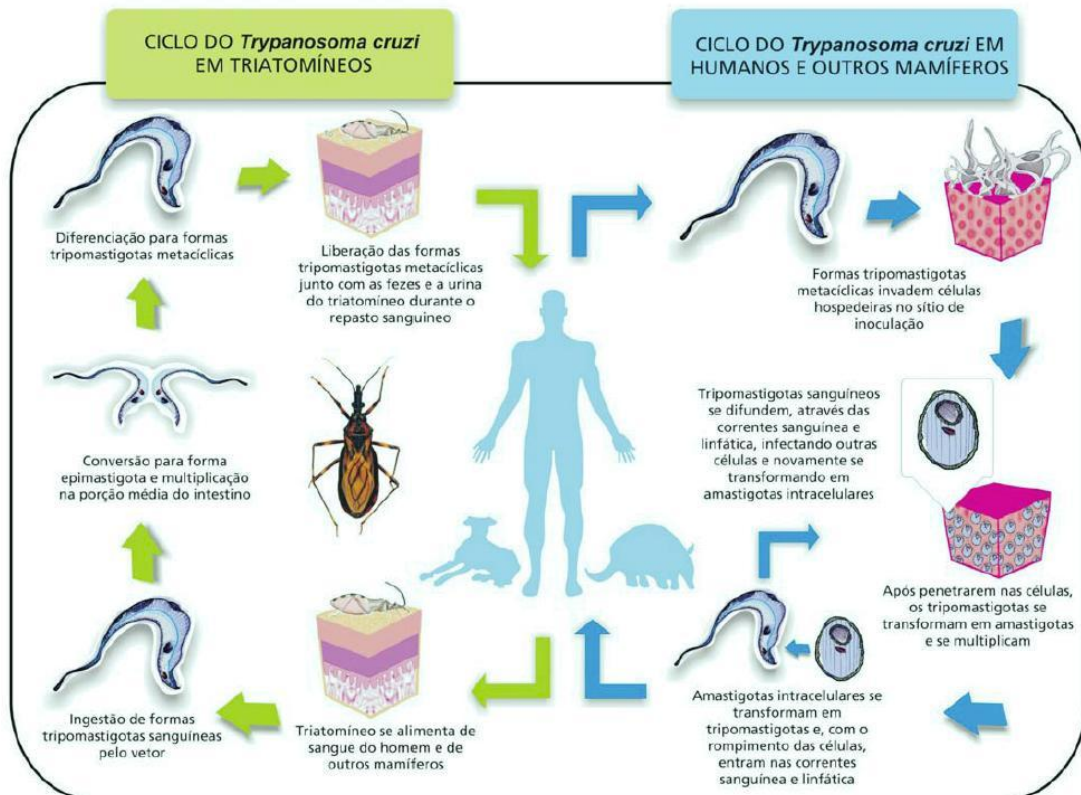


Figura 1: Distribuição da Doença de Chagas pelo mundo. Fonte: OMS

Uma vacina para prevenir a infecção pelo *T. Cruzi* ainda não foi desenvolvida e não existe uma droga quimioprolática ou tratamento realmente eficaz disponível, apesar de um esforço experimental considerável. O tratamento se baseia no alívio dos sinais e sintomas e tratamento das comorbidades associadas à Doença de Chagas (Tanowitz, 1992).

O ciclo do *T. Cruzi* em triatomíneos inicia-se com o triatomíneo alimentando-se de sangue do homem ou outros mamíferos contaminados e ingerindo assim formas tripomastigotas do protozoário. Esses se convertem em formas epimastigotas e se multiplicam no intestino do vetor. Posteriormente, ocorre a diferenciação para formas tripomastigotas e a liberação dessas junto com fezes e urina do triatomíneo durante o repasto sanguíneo. Em humanos e outros mamíferos o ciclo do *T. Cruzi* se inicia após o repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas invadem as células do hospedeiro no sítio de

inoculação. Após penetrarem nas células, os tripomastigotas se transformam em amastigotas e se multiplicam. Amastigotas intracelulares se transformam novamente em tripomastigotas e com o rompimento das células infectadas entram na corrente sanguínea e linfática e infectam outras células, reiniciando o ciclo (Tanowitz, 1992). (Figura 2).



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Figura 2: Ciclo de transmissão do *Trypanosoma Cruzii*. /Fonte ICICT/Fiocruz.

O *T. Cruzii* constitui-se de cepas ou subespécies com comportamentos peculiares, especialmente quando utilizados em modelos experimentais. A cepa Colombiana pertencente ao grupo de *T. cruzii* III, foi isolada de um caso humano na Colômbia e esta, tem sido utilizada em investigações experimentais. Essa cepa apresenta parasitemia de evolução lenta, nítido miotropismo, sobretudo,

com envolvimento de musculatura esquelética, desenvolvendo extensas lesões de fibras musculares esqueléticas, intenso processo inflamatório e lesões miocárdicas proeminentes. Em trabalhos experimentais essa cepa demonstrou maior capacidade de atravessar a barreira gástrica e produzir infecção mais intensa em camundongos, quando comparadas às outras cepas. Outra característica da cepa Colombiana, assim como, todas as cepas do biodema tipo III é a sua resistência à quimioterapia com benzonidazol e nifurtimox (Machado, 2010).

O camundongo é um modelo experimental amplamente utilizado na pesquisa de doenças infecciosas. A Doença de Chagas no modelo murino manifesta-se de forma semelhante à observada na infecção em humanos, sendo influenciada pelo background genético e pela cepa infectante, desenvolvendo uma variedade de quadros que na sua grande maioria são acompanhados de uma fase aguda sintomática que evolui para a fase crônica. Assim como no homem, na infecção murina o *T. cruzi* infecta quase todos os tipos celulares. A linhagem de camundongos C57BL/6J quando infectado pela cepa colombiana do *T. Cruzi* desenvolve intensas alterações fibróticas e inflamatórias (Machado, 2010).

As formas de infecção habituais da Doença de Chagas para o homem são: a vetorial, a transfusional, a transplacentária (congênita), e, recentemente, a infecção por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados pelo *T. Cruzi*. As formas de infecção menos habituais são acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, transplante de órgãos sólidos e leite materno (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2010).

A etiologia da doença parece ser multifatorial, envolvendo a persistência do parasita, inflamação, resposta autoimune e disfunção microvascular (Tanowitz, 2005; Hassan, 2006). A severidade da doença está correlacionada com o parasitismo do tecido cardíaco e o processo inflamatório que ocorrem nos estágios iniciais da infecção (Petkova, 2001; Dias, 2008).

A patologia possui duas fases distintas, a aguda e a crônica, sendo que a fase crônica pode ser classificada como indeterminada ou manifesta.

- **Fase aguda:** é caracterizada por elevado número de parasitas no sangue, tem duração de aproximadamente 60 dias e o paciente pode apresentar miocardite, febre, mal-estar, edema, vasculite, cefaleia, astenia e hepato-esplenomegalia (Tanowitz, 1992; Murkherjee, 2004). O pico da parasitemia ocorre 42 dias pós-infecção. Tripomastigotas podem ser encontrados também no fluido cérebro-espinhal nessa fase (Petkova, 2001; Santos, 2001; Prado, 2011; Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2005; Rocha, 2007).

Exame patológico do sistema cardiovascular em humanos e animais experimentais com cardiopatia chagásica aguda revela inflamação, mionecrose, vasculites e grande número de parasitas no sangue e tecidos. No tecido cardíaco durante a fase aguda tem-se inflamação e um espasmo microvascular, com redução do fluxo sanguíneo e isquemia local (Petkova, 2001; Santos, 2001; Murkherjee, 2004; Prado, 2011; Tanowitz, 1992; Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2005).

O eletrocardiograma (ECG) de alguns pacientes nessa fase pode apresentar-se alterado (prolongamento do intervalo R-R', ondas T inespecíficas

e baixa voltagem). A presença de arritmias, bloqueio cardíaco e falência cardíaca congestiva progressiva nessa fase inicial da doença é um indicativo de alta mortalidade (Tanowitz, 1992).

Anemia, trombocitopenia, leucocitose com predominância de linfócitos, função hepática alterada e elevação das enzimas cardíacas são achados laboratoriais comuns (Tanowitz, 1992).

- **Fase crônica:** tem início após aproximadamente 60 dias e parasitas são raramente encontrados no sangue. Na fase crônica os pacientes podem ser classificados em dois grupos: pacientes que apresentam a forma indeterminada, também chamada assintomática; e pacientes que apresentam a forma manifesta, também chamada sintomática. Quando os pacientes apresentam a forma indeterminada da doença eles são assintomáticos, aproximadamente 30 a 40% dos indivíduos. Já quando apresenta a forma manifesta os pacientes podem cursar com: insuficiência cardíaca, palpitação, dispneia, edema, dor precordial, tosse, tonturas e desmaios, cardiomegalia e cardiomiopatia crônica, aproximadamente 40 a 50% dos indivíduos (Santos, 2001; Prado, 2011; Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2005). Apesar do pequeno número de parasitas no tecido cardíaco, há o desenvolvimento de fibrose cardíaca, degeneração de cardiomiócitos e alterações vasculares, como o espasmo microvascular, que podem produzir, em muitos casos, a insuficiência cardíaca (Marin-Neto, 2007). A insuficiência cardíaca é uma das consequências mais estudadas da Doença de Chagas.

1.2 – Infecção pelo *Trypanosoma Cruzi* e sistema cardiovascular

1.2.1 – Aspectos moleculares

O *T. Cruzi* infecta vários tipos celulares no sistema cardiovascular, incluindo cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos, células endoteliais e células musculares lisas da microvasculatura cardíaca (Murkherjee, 2004; Ashton, 2007).

A invasão das células dos mamíferos é um passo crucial para a sobrevivência do parasita e estabelecimento da infecção. Durante a infecção aguda o dano patológico é correlacionado a presença do parasita, que altera alguns aspectos do metabolismo celular. Ocorre alteração da resposta celular a estímulos externos, incluindo alteração da transdução de sinais e de funções mediadas por proteína G (Tanowitz, 1992; Scharfstein, 2000). As células endoteliais da microvasculatura cardíaca são os primeiros tipos celulares a entrarem em contato com o parasita e a invasão dessas células leva a disfunção endotelial (Murkherjee, 2004).

Estudos *in vitro* demonstram que alterações no mecanismo de transdução de sinais na célula endotelial associados à infecção pelo *T. Cruzi* podem contribuir para anormalidades locais, o que provavelmente inclui o espasmo microvascular observado no modelo murino de infecção aguda. As alterações locais vistas na cardiopatia Chagásica humana fazem com que especulemos que elas são, pelo menos parcialmente, relacionadas com o espasmo da microvasculatura coronária (Tanowitz, 1992).

A infecção de células endoteliais pelo *T. cruzi* aumenta a expressão de moléculas de adesão e esse fenômeno parece ser dependente da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB). Os membros da família do NF-κB são

conhecidos por terem um papel central na regulação da inflamação e da função imune modulando a resistência do hospedeiro a infecção parasitária (Dias, 2008). Danos ao endotélio são um importante fator que contribuem com o vaso espasmo e a isquemia local. A participação direta do *T. Cruzi* causando dano endotelial e dano endotelial causado pelos mediadores da resposta inflamatória tem sido relatado (Petkova, 2001; Marin-Neto, 2007; Mukherjee, 2004).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a infecção pelo *T. Cruzi* das células endoteliais resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão vascular, importantes componentes da resposta inflamatória (Petkova, 2001). Além de causar aumento dos níveis plasmáticos do peptídeo vasoativo, endotelina-1 (ET-1) e de tromboxano A₂ (TXA₂), que promovem inflamação e proliferação celular em humanos e animais experimentais (Petkova, 2001; Camargos, 2004; Mukherjee, 2004; Tanowitz, 2005).

Em camundongos, o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) induzem a expressão da iNOS e com isso há um aumento na produção de óxido nítrico (NO), que tem seu nível elevado, com pico entre 8 a 12 dias após a infecção pelo *T. Cruzi*. Ocorre aumento também da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Martins, 1998). Devido às suas diferentes propriedades, o óxido nítrico parece ter um papel importante no controle do parasita, bem como também, no desenvolvimento das lesões no hospedeiro (Borges, 2009; Tanowitz, 1992).

Aumento na expressão proteica da iNOS e dos receptores de TXA₂ no miocárdio dos animais infectados pelo *T. Cruzi* induzem estresse oxidativo e

apoptose nesses animais (Martins, 1998). O TXA₂ pode também ser liberado pelo parasita que enzimaticamente metaboliza prostaglandina H₂ (PGH₂) para produzir TXA₂, que é biologicamente ativo. Esse parece ser neste caso, um importante modulador da sua sobrevivência e progressão da doença no hospedeiro (Ashton, 2007).

A infecção pelo parasita leva a ativação tanto da resposta imune inata quanto adquirida, levando o sistema imune do hospedeiro a produzir citocinas com o objetivo de eliminar o parasita. É sabido que IFN- γ e TNF- α tem um importante papel em controlar o parasitismo dos tecidos (Huang, 1999) Essas citocinas estão presentes em níveis elevados tanto na fase aguda quanto na crônica no tecido cardíaco (Factor, 1996; Santos, 2001; Mukherjee, 2004).

Ocorre também o aumento de vários outros mediadores pró-inflamatórios na Doença de Chagas como interleucina-4 (IL-4) que parece estar diretamente relacionada ao aumento do parasitismo e diminuição da resposta imune do hospedeiro; interleucina-2 (IL-2) que parece participar no caráter autoimune da doença em camundongos; fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), que parece estar envolvido na invasão celular pelo parasita; interleucina-5 (IL-5); interleucina-1 β (IL1- β) e interleucina-6 (IL-6) que causam alterações na função da célula endotelial como recrutamento de leucócitos, coagulação e proliferação de músculo liso, que parecem ser importantes na patogênese do Chagas (Santos, 2001; Mukherjee, 2004; Tanowitz, 1992; Scharfstein, 2000).

Citocinas como interleucina-12 (IL-12), IFN- γ , TNF- α parecem participar na resistência ao parasita. Por outro lado, interleucina-10 (IL-10) e TGF- β se opõem ao efeito protetivo do IFN- γ , apesar da IL-10 ser também importante no

controle da inflamação excessiva e diminuir a expressão local da iNOS (Torrecilhas, 2009).

1.2.2 – Tecido cardíaco

Vianna, em 1911, foi o primeiro a detalhar a patologia de Chagas. Segundo ele o coração é uma das vísceras pela qual o *T. Cruzi* mostra predileção, tanto em animais quanto em humanos (Vianna, 1911). Na doença cardíaca crônica chagásica existe uma inflamação crônica, fibrose do tecido cardíaco e aneurisma apical (Prado, 2011).

A Doença de Chagas tem semelhança com outras cardiopatias congestivas, com hipertrofia e dilatação ventricular, necrose local e fibrose do miocárdio (Factor, 1996).

Em modelo murino de infecção pelo *T. Cruzi*, o exame histológico do coração revela áreas de miocitólise, necrose e degeneração do miocárdio, associado à presença de infiltrado inflamatório e parasitas, além de formação de agregação plaquetária ocluindo o fluxo sanguíneo em pequenos vasos epicárdicos e intramiocárdicos (Prado, 2011).

Com a intensa ativação da resposta imune inata e específica, áreas de inflamação são vistas no tecido cardíaco (Torrecilhas, 2009).

A ET-1, derivada dos cardiomiócitos, parece estar envolvida na patogênese da cardiopatia Chagásica. A ET-1 produzida localmente age, em parte, aumentando a contratilidade cardíaca, estimulando a hipertrofia dos cardiomiócitos, levando a lesão desses (Huang, 1999). Em várias fases da doença, esse aumento de ET-1 parece refletir o dano endotelial e das células

do miocárdio e são um possível mecanismo da cardiopatia. Há presença de amastigotas nas células endoteliais da microcirculação coronária, associada com dano endotelial e vasoconstrição (Tanowitz, 2005).

Os danos não são limitados ao coração. Na infecção aguda de camundongos pelo *T. Cruzi* o exame do fígado mostra um grande número de amastigotas em células sinusoidais e na área próxima as veias centrais (Tanowitz, 1992).

1.2.3 – Microvasculatura cardíaca

Varias linhas de evidências patológicas, experimental e clínica sugerem que as disfunções na microvasculatura cardíaca levam a isquemia do miocárdio e provavelmente contribuem com a patogênese da Doença de Chagas (Marin-Neto, 2007; Mukherjee, 2004).

Vianna, em 1911, foi o primeiro a relatar a existência de dano vascular, postulando que no miocárdio existe inflamação perivascular, algumas bem pronunciadas e outras pouco evidentes. Em várias arteríolas que irrigam a substância nervosa, o fenômeno de inflamação perivascular também é encontrado (Vianna, 1911). Jörg em 1991 descreveu lesões vasculares caracterizadas por edema endotelial, denudação e agregação plaquetária e de fibrina em veia coletada do ventrículo esquerdo de porcos no modelo de Doença de Chagas (Jörg, 1991).

Ocorre uma ativação anormal do endotélio na presença de infecção pelo *T. Cruzi* na microvasculatura cardíaca. As células endoteliais são estimuladas a liberar citocinas, incluindo IL-1 β , IL-6, bem como, ET-1 (Factor, 1996).

As lesões microvasculares aparecem antes da presença de significativa necrose do miocárdio, 15 a 17 dias pós-infecção pelo *T. Cruzi*, sugerindo um importante papel dessas na patogênese da lesão cardíaca chagásica (Factor, 1996).

Entretanto, embora a disfunção vascular esteja presente na patologia da Doença de Chagas, pouco ou quase nada se sabe sobre o papel dessa disfunção em outros leitos vasculares, além dos vasos da microvasculatura cardíaca.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar se a infecção pela cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi* afeta, direta ou indiretamente, a função vascular da aorta de camundongos.

2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar se o parasita infecta as células endoteliais da aorta de camundongos infectados.
- Avaliar a função da aorta dos animais infectados pela cepa colombiana de *T. Cruzi* em comparação aos animais controles.
- Avaliar, os mecanismos envolvidos nas possíveis alterações da resposta vascular na aorta de camundongos infectados pela cepa colombiana de *T. Cruzi*. Para tal, avaliaremos os seguintes aspectos:
 - A participação das diferentes isoformas da NOS.
 - A participação da ET-1.
 - A participação dos derivados da COX, incluindo o TXA₂.
- Avaliar o nível de expressão de diversas proteínas envolvidas nas vias de controle do tônus vascular.
- Avaliar a existência ou não de estresse oxidativo na oarta.

- Avaliar a presença ou não de TNF- α no soro dos animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ). Os animais tiveram livre acesso à ração e água e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas com temperatura de $25 \pm 2,0$ °C. Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob os protocolos de nº 072/10.

3.1.1 - Infecção dos animais.

Os animais foram infectados com 8 semanas de idade, por via intraperitoneal, com cerca de 50 tripomastigotas da cepa Colombiana do *Trypanosoma Cruzi*. A parasitemia foi determinada a partir de uma amostra de sangue retirada da cauda nos diferentes dias após a infecção pelo método de Brener. Em cada ensaio, a sobrevivência foi monitorada diariamente e a mortalidade cumulativa determinada. A cepa Colombiana utilizada foi mantida por passagens seriais em camundongos no Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. Os animais foram sacrificados e utilizados para realização dos experimentos 30 dias após a infecção.

3.2 – Protocolos experimentais

3.2.1 – Imunofluorescência

Foi realizada a imunolocalização do antígeno TcRBP28 encontrado na cepa colombiana do *T. Cruzi* nos cortes de aorta. Para tal, as aortas foram cuidadosamente removidas, lavadas em PBS para remoção do excesso de sangue e fixadas em 10% de formalina tamponada por um período de 6 a 12h em câmara fria. Após este período, as aortas foram então acondicionadas em meio contendo 30% de sacarose em PBS por 24h em câmara fria. A partir de então, as aortas foram congeladas a -80°C até o momento do corte.

As aortas foram embebidas em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek® O.C.T™; Sakura®, USA), congeladas a -20°C e cortadas a 10 µm de espessura em um criostato (Leica 1850; Leica, USA). Após secagem, os cortes foram fixados com acetona PA gelada por 15 minutos seguido de permeabilização com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 15 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com 5% de albumina em PBS por 30-45 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com os anticorpos anti-TcRBP28 (diluído 1:100) por 1 h, em câmara fria e úmida. Após lavagens, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários específicos conjugados com o fluoróforo Alexa Fluor-467 (1:400; anti-mouse; Invitrogen, USA) por 1 h em câmara fria e ao abrigo da luz. Após lavagens, as lâminas receberam um meio de montagem contendo 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI; para marcação dos núcleos; Santa Cruz Biotechnology, USA) e foram cobertos com lamínula. As imagens foram obtidas

por microscópio de fluorescência (Eclipse Ti, Nikon, USA) em Ex/Em: 495/515 e 647/665, para elástica e TcRBP28, respectivamente.

3.2.2 – Experimentos de reatividade vascular

3.2.2.1 – Montagem dos anéis de aorta

A montagem da aorta foi feita conforme descrito pelo nosso grupo (Capettini, 2009). Os animais foram sacrificados por decapitação, a aorta torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Para obtenção do registro de tensão isométrica, esses anéis foram montados em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit (em mmol.l⁻¹: NaCl 118,3; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0 e glucose 11,1), aerada continuamente com mistura carbogênica (95 % O₂ and 5 % CO₂), mantida à temperatura de 37 ± 1 °C e pH de 7,4. Duas hastes metálicas triangulares foram passadas através do lúmen do vaso. Um dos triângulos foi fixado na base, e o outro foi conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutritora foi trocada a cada 15 minutos, objetivando-se, dessa forma, evitar o acúmulo de metabólitos, como também à restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular. Os registros experimentais foram feitos com o uso de transdutores de tensão isométrica, conectados a um amplificador, sendo este acoplado a um computador

equipado com uma placa conversora analógico-digital utilizando-se o programa Windaq para aquisição e análise dos dados experimentais.

3.2.2.2 – Avaliação da integridade do endotélio

Após o período de estabilização, os anéis foram pré-contraídos com o agonista α 1-adrenérgico fenilefrina (0,1 μ M; Sigma, USA) e, observando-se um platô no registro de contração, a presença de endotélio funcional vascular foi verificada pela administração do agonista muscarínico acetilcolina (1 μ M; Sigma, USA). Após atingir o relaxamento máximo, a solução nutritora de *Krebs-Henseleit* foi trocada (por três vezes). O procedimento anteriormente descrito foi repetido após 30 minutos. Foram considerados vasos contendo endotélio funcional aqueles onde a acetilcolina induziu uma resposta relaxante superior a 80 %.

3.2.2.3 – Remoção do endotélio

Quando necessário, o endotélio vascular foi removido mecanicamente com o auxílio de uma haste metálica friccionada de forma delicada ao lúmen vascular. A ausência de endotélio funcional foi confirmada pela ineficácia da acetilcolina em relaxar os vasos pré-contraídos com fenilefrina.

3.2.2.4 – Avaliação da resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina

Após o período de estabilização e teste funcional do endotélio vascular, curvas concentração-resposta cumulativas em resposta a acetilcolina (0,001-100 μ M) foram realizadas nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (0,1

μM). Afim de estudar o possível envolvimento da NOS, os vasos foram incubados por 20 minutos com N^y-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 300 μM). A resposta obtida nos animais infectados foi comparada com os animais controles.

3.2.2.5 – Avaliação da resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina

Após o período de estabilização e teste funcional do endotélio vascular, curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina (0,0001 a 10 μM) foram realizadas nos anéis de aorta. Com a finalidade de se estudar a participação da NOS e de suas isoformas, os anéis de aorta foram pré-incubados por 20 minutos com L-NAME (300 μM), NG-Nitro-L-Arginine (L-NNA, 1 μM) ou L-N6-(1-Iminoethyl)lysine hydrochlor (L-NIL, 10 μM), inibidores da NOS. O L-NAME é um inibidor não-seletivo das NOS. Na concentração utilizada, o L-NNA é inibidor seletivo da eNOS quando comparada a iNOS e o L-NIL inibe seletivamente a iNOS. Alguns anéis foram incubados também com o bosentano (10 μM), antagonista dos receptores da ET-1 e Ibuprofeno (1 μM), inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX) e indiretamente da síntese do TXA₂; e também o antagonista dos receptores de TXA₂, SQ28668 (1 μM), para avaliar a possível participação dessas vias. Foram utilizados ainda para incubação de alguns anéis de aorta o sequestrador de ânions superóxido, tiron (10 μM) e a enzima superóxido dismutase SOD (300 UI) para avaliar a participação do superóxido. Em seguida, na presença das drogas citadas, foram realizadas novas curvas concentração-resposta cumulativas a fenilefrina. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas obtidas na ausência dessas drogas.

3.2.3 - Western-blot

3.2.3.1 - Determinação da expressão protéica da eNOS e da iNOS por

Western blot

Os tecidos congelados a -80°C foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris 50 mM; EDTA.2Na 5 mM; MgCl_2 1 mM) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de *cocktail* de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). Os tecidos foram homogeneizados a uma proporção de 25 mg de tecido para 100 μl de tampão de lise enriquecido com o *cocktail* de inibidores de proteases. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 8 minutos. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 30 μg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 7,5%. Após serem separadas no gel de poliácridamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45 μm . A qualidade da transferência foi monitorada através da transferência das bandas do padrão de peso molecular. A membrana foi colocada por 3 horas em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 3 % de albumina). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria

(6-8 °C), com o anticorpo primário específico diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-iNOS (1:1000; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti-eNOS (1:2000; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz), anti-nitrotirosina (1:2000; monoclonal feito em camundongo Santa Cruz Biotechnology Inc - Santa Cruz, CA, EUA), anti-beta-actina (1:3000; monoclonal feito em camundongo; Millipore®) e anti-GAPDH (1:3000; policlonal feito em coelho; Sigma, St. Louis, MO). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0.3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:8000, anti-mouse IgG-HRP e anti-rabbit IgG-HRP, Sigma, St.Louis, MO) diluído em 1% de albumina em TBS-T. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas protéicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ 1.4. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD, CA, USA).

3.2.3.2 - Determinação da funcionalidade da eNOS por análise do grau de fosforilação em resíduos de serina e treonina, por Western blot

As amostras foram coletadas, processadas, separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose de acordo com a metodologia descrita anteriormente para o Western blot das isoformas não fosforiladas.

Entretanto, para se evitar a desfosforilação dos resíduos de aminoácidos avaliados, foram acrescentados ao tampão de lise inibidores de fosfatase (NaF 20 mM; Na₃VO₄ 0,1 mM; PMSF). Após os procedimentos de bloqueio padrão, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-phospho-eNOS Ser1177 (1:500; policlonal feito em cabra; Santa Cruz), anti-phospho-eNOS-Thr495 (1:500; policlonal feito em cabra; Santa Cruz) e anti-goat IgG-HRP, (1:8000 Sigma, St.Louis, MO). Os valores das intensidades das bandas obtidos foram normalizados pelos valores das análises da isoformas totais de cada amostra.

3.2.4 – Dosagem de óxido nítrico e superóxido por microscopia de fluorescência

A concentração intracelular de NO e O₂⁻ nas células musculares lisas e endoteliais foi avaliada indiretamente utilizando a sonda fluorescente intracelular sensível ao NO, 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína Diacetato (DAF-FM diacetato; 10 µM; Invitrogen, USA) ou a sonda indicadora da concentração de O₂⁻, Dihidroetídio (DHE; 10 µM; Invitrogen, USA), respectivamente. Semelhante ao que foi descrito para o experimento de imunofluorescência, a aorta foi removida e segmentos destas foram embebidos em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek® O.C.T™, Sakura®), congeladas a -20°C e cortadas a 10 µm de espessura em um criostato (Leica 1850; Leica, USA). Após a secagem, os cortes receberam ou não meio de montagem contendo Tiron (10 µM; Merck-Millipore, USA) ou L-NIL (10 µM; Merck-Millipore, USA). Posteriormente foram incubados por 30 minutos com as sondas citadas acima, a 37°C em câmara úmida, protegidos da luz. As

lâminas foram então lavadas com PBS para a remoção do excesso de marcação. Essas receberam meio de montagem contendo 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI, para marcação dos núcleos; Santa Cruz Biotechnology, USA). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Eclipse Ti, Nikon, USA). A intensidade de fluorescência (Ex/Em: 518/605 e 495/515, para DHE e DAF-FM, respectivamente) foi calculada usando o programa ImageJ (NIH, USA).

3.2.5 - Quantificação de TNF- α no soro por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A concentração sérica do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) foi avaliada utilizando kit específico (Mouse TNF- α , R&D Systems) seguindo as especificações do fabricante. Brevemente, a placa de 96 poços foi incubada com a solução de anticorpo de captura overnight em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, o bloqueio da placa foi realizado por 1 hora em temperatura ambiente com reagente diluente. Para o procedimento do ensaio, essa foi incubada por 12 horas a temperatura ambiente com as amostras e o padrão. Para determinação da densidade ótica, foram realizadas leituras no comprimento de 450nm e correção no 540nm, utilizando o leitor de microplaca Thermo Plate. Os dados foram analisados utilizando o software Graph Pad Prism 4.

3.3 - Análises estatísticas e expressão dos resultados

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0. Os dados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução da contração em resposta a fenilefrina. As curvas concentração-resposta cumulativas foram comparadas pelo método two-way ANOVA para medidas repetidas. $E_{máx}$ representa a concentração da droga que produziu o efeito máximo na resposta contrátil ou relaxante. Os dados de Western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de β -actina ou GAPDH de cada amostra. As imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência por área. Os resultados expressos por gráficos de barras foram comparados pelos testes t de Student. Todos os resultados foram expressos como média \pm EPM e considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashton AW, Mukherjee S, Nagajyothi FNU, Huang H, Braunstein VL, Desruisseaux, et al (2007). Thromboxane A2 is key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma Cruzi* infection. The Journal of Experimental Medicine 204 : 929-940.

Borges CRB, Junior VR, Reis MA, Castellano LR, Chica JEL, Pereira SAL, et al (2009). Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma Cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42: 170-174.

Camargos ERS, Rocha LLV, Rachid MA, Almeida AP, Ferreira AJ, Teixeira-Jr AL, et al (2004). Protective role of ETA endothelin receptors during the acute phase of *Trypanosoma Cruzi* infection in rats. Microbes and Infection 6: 650-656.

Capettini, LS, Campos, LV, Dos Santos, MH, Nagem, TJ, Lemos, VS, Cortes SF (2009). Vasodilator and antioxidant effect os xanthones isolated from Brazilian medicinal plants. Planta Medica 75: 145-148.

Dal-Ros S, Bronner C, Auger C, Schini-Kerth VB (2012). Red wine polyphenols improve an establish aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 419: 381-387.

Dhiman M, Nakayasu ES, Madaiah YH, Reynolds BK, Wen J, Almeida IC, et al (2008). Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma Cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins. *The American Journal of Pathology* 173: 728-740.

Dias WB, Fajardo FD, Graça-Souza AV, Freire-de-Lima L, Vieira F, Girard MF, et al (2008). Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma Cruzi*. *Celular Microbiology* 10: 88-99.

Factor SM, Wittner M, Tanowitz HB (1996). Chagas' Disease: Microvascular and interstitial matrix abnormalities characteristic of congestive cardiomyopathy of diverse etiology. *Cardiovascular Pathology* 5: 203-207.

Fleming I (2010). Molecular mechanism underlying the activation of eNOS. *European Journal of Physiology* 459: 793-806.

Hassan GS, Mukherjee S, Nagajyothi F, Weiss LM, Petkova SB, Almeida CJ, et al (2006). *Trypanosoma Cruzi* infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells. *Infection and Immunity* 74: 152-159.

Huang H, Chan J, Wittner M, Jelicks LA, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, et al (1999). Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide

synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31: 75-88.

Hurst JK (2002). Whence nitrotyrosine?. *The Journal of Clinical Investigation* 109: 1287-1289.

Jörg ME (1991). Reactividad de endotelios vasculares frente a antígenos del *Trypanosoma Cruzi*. *CM: Publicación Médica* 4:134-143.

Kerth-Schini V, Auger C, Kim J, Etienne-Selloum N, Chataigneau T (2010). Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *European Journal of Physiology* 459: 853-862.

Kopincová J, Púžserová A, Bernátová I (2011). Review: Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology* 4: 63-68.

Machado JR. Avaliação de citocinas em diferentes linhagens de camundongos infectados com as cepas Y e Colombiana de *Trypanosoma cruzi*. 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Uberaba.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV (2007). Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *Circulation* 115: 1109-1123.

Martins GA, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Silva JS (1998). Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma Cruzi* infection in mice. *Immunology Letters* 63: 113-120.

Mukherjee S, Huang H, Petkova SB, Albanese C, Pestell RG, Braunstein VL, et al (2004). *Trypanosoma Cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Infection and Immunity* 72: 5274-5282.

Prado CM, Jelicks LA, Weiss LM, Factor SM, Tanowitz HB, Rossi MA (2011). The vasculature in Chagas Disease. *Advances in Parasitology* 76: 83-99.

Petkova SB, Huang H, Factor SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, et al (2001). The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *International Journal for Parasitology* 31: 499-511.

Rocha MOC, Teixeira MM, Ribeiro AL (2007). An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 5: 1-12.

Santos PVA, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino APMP, Paiva CN, et al (2001). Prevalence of CD8⁺αβ T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis

is associated with acquisition of CD 62L^{low}LFA-1^{high}VLA-4^{high} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes and Infection* 3: 971-984.

Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MMA, Lima APCA, Morrot A, et al (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma Cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B₂ receptors. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 1289-1299.

Schini-Kerth VB, Auger C, Kim JH, Etienne-Selloum N, Chataigneau T (2010). Nutricional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *European Journal of Physiology* 459: 853-862.

Secretaria de Vigilancia em Saúde do Ministério da Saúde (2005). Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 7-26.

Tanowitz HB, Burns ER, Sinha AK, Kahn NN, Morris SA, Factor SM (1990). Enhanced Platelet Adherence and Aggregation in Chagas' Disease: A Potential Pathogenic Mechanism for Cardiomyopathy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43: 274-281.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M (1992). Chagas' Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 5: 400-419.

Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loredó ML, Weiss LM (2005). Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infection and Immunity* 73: 2496-2503.

Torreilhas ACT, Tonelli RR, Pavanelli WR, Silva JSS, Schumacher RI, de Souza W, et al (2009). *Trypanosoma Cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection* 11: 29-39.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, da Silva MAM, Gomes ACM (2007). Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirevisão. *Revista Brasileira de Hipertensão* 14: 269-274.

Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S (2009). Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *British Journal of Pharmacology* 157: 527-536.

Vianna G (1911). Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* : 277-294.

Zhang Y, Tocchetti CG, Krieg T, Moens AL (2012). Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Radical Biology and Medicine* 53: 1531-1540.