
Andrea Moraes Torres Pinto

**INFECÇÃO *IN VITRO* COM *TRYPANOSOMA CRUZI*
MODIFICA O PADRÃO DE SECREÇÃO DE
CARDIOMIÓCITOS**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2006

Andrea Moraes Torres Pinto

**INFECÇÃO *IN VITRO* COM *TRYPANOSOMA CRUZI*
MODIFICA O PADRÃO DE SECREÇÃO DE
CARDIOMIÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2006

Dissertação realizada no Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva e co-orientação da Profa. Conceição Ribeiro da Silva Machado, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

**À minha querida turma de Ciências
Biológicas 2º semestre de 1999. Não teria
chegado até aqui sem a ajuda e
amizade de vocês.**

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Elizabeth Ribeiro da Silva, minha orientadora e amiga a vários anos.

Quem me despertou para a ciência, minha referência.

À Prof^ª. Conceição Machado pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação, de paixão pela vida e pelo trabalho. .

À Prof^ª Patrícia Massara Martinelli pela atenção, dedicação e presença constantes.

À Prof^ª Luciana Andrade que entrou no laboratório quando mais precisava, que deu uma nova luz a essa dissertação.

À Prof^ª Leonor Guerra do Laboratório de Neurobiologia pela agradável convivência e disponibilidade.

Aos professores do Departamento de Morfologia.

Aos técnicos do laboratório de Neurobiologia Carlos Henrique da Silva, Maria Luiza da Silva, Pedro Almeida.e Afonso da Costa Viana, do laboratório do Prof. Egler Chiari.

Aos técnicos do Centro de Bioterismo da UFMG

À secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, Iraídes Silva de Jesus.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular, em especial Talles Prósperi e Érica Abjaudi, também colegas de laboratório.

Aos amigos do laboratório, em especial Luciana Hoffert e Cecília Marques.

Aos queridos alunos, antigos e novos de iniciação científica do laboratório de Neurobiologia, Stanley, Flávia Albuquerque e meus braços direito e esquerdo, Hugo Rezende e Rafael Ribeiro.

À minha família, companheira em todos os momentos. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais.

Ao Rodrigo Moraes, que apareceu para me ajudar a resolver uma contaminação e acabou contaminando de amor a minha vida.

Ao Prof Egler Chiari pela cessão dos isolados de *Trypanosoma cruzi*.

A Profa Daniela Bartholomeu pela cessão dos isolados de *Trypanosoma cruzi*.

A pesquisadora Catherine Ropert do Centro de Pesquisa René Rachou pela cessão dos isolados de *Trypanosoma cruzi*.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia Maria Auxiliador Carvalho, Ary Correa, Maria Aparecida de Resende e Luiz de Macedo, pelo auxílio na identificação de contaminantes de cultura.

A Luciana Maria Silva, coordenadora do Laboratório de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias, pelo estágio em cultivo de células.

A Prof^a Rosa Arantes do departamento de Patologia, pelo auxílio na obtenção de imagens da cultura de cardiomiócitos.

Aos alunos Elizandra e André do laboratório de Desenvolvimento do Coração.

A querida amiga e antiga companheira de laboratório Patrícia Nagib, um exemplo.

As minhas amigas de infância Lari, Pri, Mari e Fabi, por **Tudo**.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Lista de abreviaturas | 9 |
| Lista de gráficos | 12 |
| Lista de figuras | 13 |
| Resumo | 14 |
| Abstract | 15 |
| 1. Introdução | 17 |
| 2. Objetivos | 30 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 30 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 30 |
| 3. Metodologia | 32 |
| 3.1. Isolamento e preparação de cultura de cardiomiócitos..... | 32 |
| 3.2. Obtenção do <i>T. cruzi</i> | 32 |
| 3.3..Infecção de cardiomiócitos..... | 33 |
| 3.4. Visualização dos cardiomiócitos | 34 |
| 3.5. Dosagens em sobrenadantes de culturas | 35 |
| 3.5.1. Dosagem de nitrito..... | 35 |
| 3.5.2. Dosagem de TNF- α | 35 |
| 3.5.3. Dosagem de IL-1 β | 36 |
| 3.5.4. Dosagem de NGF..... | 37 |
| 3.6. Análise estatística e confecção dos gráficos..... | 37 |
| 4. Resultados | 39 |
| 4.1. Morfologia de cardiomiócitos..... | 39 |
| 4.2. Morfologia de cardiomiócitos infectados com a cepa Y ou com o clone CL-Brener.de <i>T. cruzi</i> | 42 |
| 4.3 Níveis de nitrito em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> | 46 |
| 4.4 Níveis de TNF- α em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> | 48 |

| | |
|--|-----------|
| infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> | |
| 4.5. Níveis de IL-1 β em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> | 50 |
| 4.6. Níveis de NGF em sobrenadantes de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> | 52 |
| 5. Discussão | 55 |
| 6. Conclusões | 64 |
| 7. Referências bibliográficas | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| Akt | Serina/treonina kinase |
| AMPC | Adenosina monofosfato |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| Ca ²⁺ | Íon Cálcio |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| Crg-2 | Cytokine responsive gene 2 |
| DMEM | Dulbeco`s modified Eagle`s medium |
| ED1 ⁺ | Macrófagos recrutados do sangue |
| ED2 ⁺ | Macrófagos residentes |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| Fig | Figura |
| gp | glicoproteína |
| GRAF | Gráfico |
| H ⁺ | Íon Hidrogênio |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular 1 |
| IFN | Interferon |
| IFN-γ | Interferon gama |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IP ₃ | Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato |
| KC | Quimiocina derivada de queratinócito |
| LLC-MK2 | Linhagem de fibroblastos de rim de macaco |
| M199 | Médium 199 |
| MCP-1 | |
| ou CCL-2 | Ligante tipo 2 de quimiocina |
| ou JE | |

| | |
|--------------------|--|
| Mig ou CXCL-9 | Monocina induzida por interferon gama |
| MIP-2 | Proteína inflamatória de macrófago |
| MI | Mililitro |
| μ M | Micro molar |
| NF- κ B | Fator de transcrição nuclear kappa B |
| NGF | Fator de Crescimento Neural |
| NK | Célula natural “killer” |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Enzima óxido nítrico sintase |
| NOS1 ou NOSn | Enzima óxido nítrico sintase tipo 1 ou neuronal |
| NOS2 ou NOSi | Enzima óxido nítrico sintase do tipo 2 ou induzida |
| NOS3 ou NOSe | Enzima óxido nítrico sintase do tipo 3 ou endotelial |
| NT-3 | Neurotrofina 3 |
| NT-4/5 | Neurotrofina 4/5 |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OPS | Organização Panamericana de Saúde |
| PAMP | Padrão molecular associado a patógeno |
| PAS | Ácido periódico de Schiff |
| PBS | Tampão salina fosfato |
| pg | Picograma |
| PI-3K | Fosfatidilinositol 3 kinase |
| PLC | Fosfolipase C |
| PPR | Receptor de reconhecimento de padrão |
| PTK | Proteína tirosina kinase |
| RANTES ou CCL-5 | Ligante tipo 5 de quimiocina |
| RNA _m | Ácido ribonucléico mensageiro |
| SFB | Soro fetal bovino |
| TGF- β | Fator de crescimento tumoral beta |
| TIR | Toll/receptor interleucina 1 |
| TLR | Receptor do tipo Toll |

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| TNFR | Receptor de fator de necrose tumoral |
| Trk | Receptor do tipo tirosina kinase |
| TrkA | Receptor do tipo tirosina kinase A |
| TrkB | Receptor do tipo tirosina kinase B |
| TrkC | Receptor do tipo tirosina kinase C |
| TS | Trans-sialidase |
| VCAM-1 | Molécula de adesão vascular celular 1 |
| VERO | Células epiteliais de rim de macaco |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| GRÁFICO 1 - Produção de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 47 |
| GRÁFICO 2 - Produção de TNF- α em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 49 |
| GRÁFICO 3 - Produção de IL-1 β em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 51 |
| GRÁFICO 4 - Produção de fator neurotrófico (NGF) em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por <i>T.cruzi</i> | 53 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ativação de diferentes cascatas sinalizadoras de Ca^{+2} por diferentes isolados de <i>T. cruzi</i> durante o processo de invasão celular..... | 20 |
| Figura 2. Neurotrofinas e seus respectivos receptores..... | 27 |
| Figura 3. Cardiomiócitos não infectados aos 9 dias de cultivo em meio DMEM + M199..... | 40 |
| Figura 4. Cardiomiócitos não infectados aos 5 dias de cultivo em meio DMEM + M199..... | 41 |
| Figura 5: Cardiomiócitos aos 9 dias de cultivo, infectados ou não, com a cepa Y, em meio DMEM + M199:..... | 44 |
| Figura 6: Cardiomiócitos aos 9 dias de cultivo, infectados ou não, com o clone CL-Brener em meio DMEM + M199:..... | 45 |

Resumo

Neste trabalho abordamos um aspecto da tripanosomíase americana, doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e que afeta 17 milhões de pessoas na América Latina, concernente à interação deste parasita com cardiomiócitos. Assim, avaliamos a produção de óxido nítrico (NO), citocinas (TNF- α e IL-1 β) e NGF (fator de crescimento neural) por cardiomiócitos infectados com a cepa Y e o clone CL-Brener.

A infecção com ambas as populações de *T. cruzi* resultou em desagregação do sincício e posterior morte dos cardiomiócitos. A infecção com a cepa Y resultou em maior número de amastigotas intracelulares que o clone CL-Brener. Com relação à dosagem de NO, a cepa Y induziu a produção de NO no primeiro dia de infecção e o clone CL-Brener no 1^o e 2^o dias de infecção. Os níveis de NO induzidos pelo clone CL-Brener foram superiores aos induzidos pela cepa Y. A cepa Y e o clone CL-Brener induziram a produção de TNF- α no primeiro dia de infecção, sendo os níveis induzidos pela cepa Y maiores que o clone CL-Brener. A cepa Y e clone CL-Brener induziram a produção de IL-1 β no 1^o dia de infecção, sendo que os níveis induzidos pela cepa Y apresentaram tendência a serem mais elevados. Em culturas de cardiomiócitos infectadas com a cepa Y ocorreu produção de NGF somente no primeiro dia de infecção. Já a infecção com o clone CL-Brener induziu a produção de NGF no 1^o e 2^o dias de infecção, sendo os níveis do 1^o dia superiores ao 2^o. Os níveis de NGF induzidos pela cepa Y foram significativamente maiores que os induzidos pelo clone CL-Brener no 1^o dia de infecção. Esses resultados indicam a participação do NGF em outros fenômenos que não o de regeneração de fibras nervosas, e que a infecção pelo *T. cruzi* altera o padrão de secreção de cardiomiócitos.

Abstract

In the present work we have analyzed one aspect of the American trypanosomiasis, disease caused by *Trypanosoma cruzi* and that affects 17 million people in the Latin American, concerning the interaction of this parasite with the cardiomyocytes. In this way nitric oxide (NO), cytokines (TNF- α e IL-1 β) and nerve growth factor (NGF) production were evaluated in cardiomyocytes infected with two isolates of *T. cruzi*, Y strain and CL-Brener clone.

The infection with both *T. cruzi* isolates resulted in syncitium desagregation and cardiomyocyte death. The Y strain infection induced higher number of intracelullar amastigotes than the infection with the CL-Brener clone. Concerning the NO production, the Y strain caused increased NO levels only at day 1 and the CL-Brener clone at days 1 and 2. The NO levels were significantly greater with CL-Brener infection. Both *T. cruzi* isolates induced TNF- α secretion at day 1 of infection, but the Y strain was more effective than the CL-Brener clone. Both Y strain and Brener also induced IL-1 β secretion at day 1 of infection. The cardiomyocytes infected with both *T. cruzi* isolates produced higher NGF levels than the control ones, and the secretion was maintained for 2 days or 1 day, for CL-Brener clone and Y strain, respectively. The NGF production induced by the Y strain was higher than those induced by the CL-Brener clone. These results indicate a role for NGF in different pathways, not only in nerve fiber regeneration, and that *T. cruzi* infection alters the pattern of secretion in the cardiomyocytes.

1. INTRODUÇÃO

1 Introdução

A doença de Chagas (tripanosomíase americana), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* é uma zoonose típica das regiões tropical e subtropical da América Latina, estendendo-se até a região sudeste dos Estados Unidos da América (Dias, 2006a). Essa doença é responsável pela morte de pelo menos 50.000 pessoas a cada ano, devida, principalmente, à falência cardíaca congestiva. Atualmente, estima-se que 18 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas e 100 milhões em situação de risco em 21 países da América Latina (The Lancet editorial 2006). Em junho de 2006, o Brasil recebeu uma certificação concedida pela OPS/OMS (Organização Panamericana de Saúde/ Organização Mundial de Saúde) relativa à eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor, *Triatoma infestans*, e por transfusão de sangue (Dias, 2006b).

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas, a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda observam-se tripomastigotas na corrente sanguínea e ninhos de amastigotas em vários órgãos, mas principalmente em células musculares. Nessa fase, os parasitas invadem diferentes tipos celulares e se multiplicam. Quando a célula se rompe liberando novamente as formas tripomastigotas para circulação, os produtos celulares restantes desencadeiam tanto uma resposta imune inflamatória local quanto sistêmica. Há aumento dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (fator de necrose tumoral), IL-6 (interleucina 6) e de mRNA para TNF- α , IL-6 e IL-1 β no miocárdio (Chandrasekar, *et al.* 1998). As principais alterações patológicas no coração são miocardite, congestão, edema, infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, e aumento das câmaras cardíacas (Prata, A., 1994).

Na fase crônica ocorre diminuição drástica no número de parasitas, tanto no sangue quanto nos tecidos. Descrevem-se três formas clínicas distintas, assintomática (indeterminada), cardíaca (cardiomiopatia chagásica) e digestiva (megacólon e/ou megaesôfago). A forma assintomática é a mais freqüente, sendo encontrada em, aproximadamente, 70% da população de chagásicos crônicos (revisto em Tanowitz *et al.*, 1992; revisto em Prata, 2001). Dentre as formas sintomáticas, a cardiomiopatia, caracterizada por

fibrose miocárdica e cardiomegalia, é a manifestação clínica mais comum, com altos índices de mortalidade decorrente de insuficiência cardíaca congestiva ou arritmia (Chandrasekar, *et al.* 1998). A forma digestiva parece apresentar implicações epidemiológicas, uma vez que essa forma clínica não é encontrada em pacientes chagásicos crônicos da Colômbia, Venezuela, América Central e México (Kirchhoff, 1996).

O *T. cruzi* é pleomórfico, exibindo diferentes formas durante seu ciclo de vida dependente de dois hospedeiros - um inseto vetor e um mamífero (Kirchhoff, 1996). As formas evolutivas do *T. cruzi* definem-se através de sua forma esférica, piriforme ou alongada, das posições relativas do núcleo e cinetoplasto e da posição do flagelo em relação à bolsa flagelar (Brener, 1987; Souza, 2000). São elas epimastigota, tripomastigota, amastigota e esferomastigota, sendo essa última encontrada no estômago do inseto vetor e em determinadas situações experimentais *in vitro*.

O *T. cruzi* apresenta grande variabilidade genética, caracterizada por uma estrutura populacional clonal (Tibayrenc, 1995; Laurent *et al.*, 1997). Cada população ou isolado possui origem conhecida e é mantida em cultura ou por passagens sucessivas em animais de laboratório (Lumsden, 1970, citado por Andrade, 1974). As várias populações de *T. cruzi* isoladas de pacientes ou testadas em animais se diferenciam quanto a sua morfologia, virulência, capacidade patogênica, resposta a quimioterápicos e potencial imunogênico (Plumas-Marty *et al.*, 1992; Neira *et al.*, 2002). A variabilidade genética do parasita tem sido evidenciada por sua composição antigênica (Andrade *et al.*, 1981) e por caracterização molecular do DNA de cinetoplasto-kDNA (Morel *et al.*, 1980; Vago *et al.*, 1996).

Nos mamíferos, o ciclo evolutivo do *T. cruzi* inicia-se com a penetração, pela pele lesada ou mucosa, de tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes e urina do inseto vetor (Brener, 1987; Teixeira, 1987;). A forma tripomastigota circula na corrente sanguínea e invade as células hospedeiras e, inicialmente, aloja-se no interior de um vacúolo endocítico, o vacúolo parasitóforo (Carvalho & De Souza, 1989). A exposição das formas tripomastigotas a este ambiente ácido é necessária à secreção e atividade da proteína TcTox, atuante na formação de poros na membrana vacuolar e, conseqüentemente, no escape para o citoplasma. O meio ácido parece,

também, ter papel importante no início da diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, forma intracelular proliferativa. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma (Tanowitz *et al.*, 1992; Kirchhoff, 1996; Burleigh & Woolsey, 2002). Após escapar do vacúolo, o *T. cruzi* se diferencia na forma amastigota e permanece livre no citoplasma da célula hospedeira em estado quiescente por algumas horas e inicia, posteriormente, seu processo de replicação por fissão binária (revisto por Sibley *et al.*, 2000). Em seguida, diferenciam-se, novamente, em tripomastigotas.

A intensa movimentação gerada pelos parasitas no interior da célula hospedeira promove sua ruptura e, conseqüentemente, a liberação dos tripomastigotas no meio extracelular tornando-os capazes de infectar novas células (Brenner, 1973; Souza, 2000). A ruptura da célula parasitada determina reação inflamatória focal, caracterizada pela presença de neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos e células mononucleares, além de congestão e edema (Prata, 1994; Andrade, 2000).

De acordo com Araújo-Jorge *et al.* (1992), o parasita pode utilizar diferentes mecanismos de invasão, relacionados com os receptores e ligantes disponíveis na superfície de células-alvo específicas. O processo de invasão inicia-se com a adesão do parasita à superfície celular, entretanto, o grau de adesão varia de acordo com a população do parasita, com a forma evolutiva e com a célula-alvo. Os tripomastigotas são capazes de parasitar diferentes tipos celulares como fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, fibroblastos, macrófagos e células gliais (Andrade, 2000). Diferentes tipos de carboidratos, presentes nas glicoproteínas e nos glicolipídeos da superfície do parasita e da célula hospedeira, parecem participar desse processo de adesão (Meirelles *et al.*, 1999; Calvet *et al.*, 2004). Glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* são importantes para mobilização do cálcio intracelular, tanto do parasita quanto da célula hospedeira, sendo este fenômeno de extrema importância para o processo de interiorização do parasita. De acordo com Schenkman *et al.* (1991) a adesão dos tripomastigotas à superfície celular, mediada por receptores, está restrita a certas regiões da membrana. Segundo Ruiz *et al.* (1998) a capacidade dos tripomastigotas, de diferentes isolados de *T. cruzi*, de invadir as células

hospedeiras é determinada pela expressão diferencial de glicoproteínas de superfície que exibem atividade sinalizadora de cálcio distinta.

A análise de moléculas de superfície dos parasitas possibilitou sua divisão em dois grupos distintos quanto a capacidade de invasão, *in vitro*, de células de mamíferos (Yoshida, 2006). As populações que apresentam maior capacidade infectante não possuem as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50. Tripomastigotas dos isolados mais infectivos, como o clone CL-Brener, ligam-se à superfície da célula hospedeira através de gp82 e induzem a ativação de PTK (proteína tirosina kinase). Essa sinalização também envolve a ativação da fosfolipase (PLC), a geração de IP₃ (fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato) e, conseqüentemente, a mobilização de Ca²⁺ dos seus estoques intracelulares, provavelmente retículo endoplasmático.

Por outro lado, em isolados de menor capacidade infectiva, como a cepa G, a ligação à superfície celular ocorre principalmente através de gp35/50, que promove uma cascata de sinalização menos eficiente. Nesses isolados, a cascata de sinalização é independente de PTK e PLC e provavelmente dependente de AMPc (AMP cíclico). O Ca²⁺ necessário para invasão parece ser liberado para o citosol a partir de vacúolos contendo um sistema de troca iônica Ca²⁺/H⁺, também chamados acidocalcisomas (Fig. 1; revisto em Yoshida, 2006).

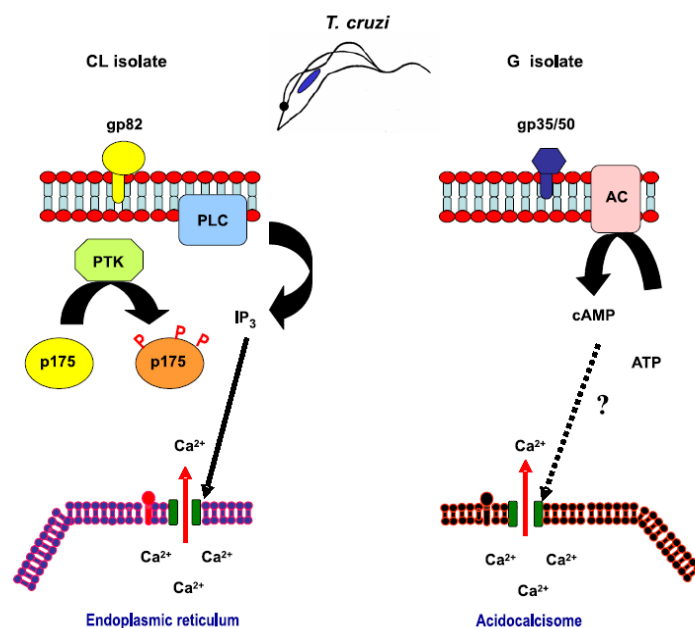


Figura 1.

Ativação de diferentes cascatas sinalizadoras de Ca²⁺ por diferentes isolados de *T. cruzi* durante o processo de invasão celular.

Segundo Andrews (1995) essa elevação dos níveis intracelulares de cálcio, na célula hospedeira, promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasita seguido por sua fusão com a membrana e formação do vacúolo parasitóforo. Os lisossomos são deslocados por uma proteína motora associada aos microtúbulos, a cinesina (Tardieux *et al.*, 1992; Rodríguez *et al.*, 1996). Além disso, o processo de invasão é facilitado pela ruptura de microfilamentos de actina (Tardieux *et al.*, 1992). A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} promove a fusão dos lisossomos com o plasmalema. A proteína sinaptotagmina VII, membro da família sinaptotagmina, está presente na superfície dos lisossomos de diferentes tipos celulares e possui um domínio de ligação ao Ca^{2+} , regulando esse processo (Caler *et al.* 2001; Yoshida, 2006).

Outras moléculas de superfície do parasita também participam do processo de invasão celular. Oligopeptidase B(Opb), uma serina endopeptidase expressa pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, é capaz de ativar uma cascata de sinalização de Ca^{2+} dependente de PLC e IP3 (Burleigh & Andrews, 1995b; Rodríguez *et al.*, 1995). A cruzipaina, uma cisteína proteinase expressa em todas as formas do ciclo de vida do *T. cruzi* (Paiva *et al.*, 1998), também ativa cascatas de sinalização mobilizadoras de Ca^{2+} , aumentando assim a eficácia do processo de invasão celular. Já a trans-sialidase (TS) transfere ácidos siálicos $\alpha(2,3)$ -ligados de glicoproteínas e glicolipídios da superfície da célula-alvo para a superfície do parasita (Schenkman & Mortara, 1992). O processo de sialização é importante para início do processo de adesão e para formação de vacúolos parasitóforos eficientes. A presença do ácido siálico parece ser fundamental para correta justaposição das membranas do vacúolo nascente e dos tripomastigotas, promovendo a vedação do vacúolo e assim impedindo que *T. cruzi* escape durante o processo de internalização (Ley *et al.* 1990; Hall *et al.* 1992; Lopez *et al.* 2002).

Fosfatidilinositol 3 kinase (PI-3 Kinase) e Akt (serina/treonina kinase) também são importantes reguladores do processo de invasão do *T. cruzi* em células não fagocíticas profissionais (Wilkowsky *et al.* 2001). As PI-3K regulam o processo de tráfico de membranas, fusão de endossomas e rearranjo do citoesqueleto (Downward, 2004). Esse processo de sinalização

provavelmente modula a invasão mediada por lisossomas ou um outro associado à actina (Procópio *et al.*, 1999). Além de participar no processo de invasão, a via sinalização PI3K/Akt também estimula mecanismos pró-sobrevivência nas células parasitadas (Chuenkova *et al.*, 2001).

Outra via de sinalização importante para invasão do *T. cruzi* é a que envolve o Fator de Crescimento Tumoral Beta (TGF β). TGF β é uma citocina que participa de inúmeros eventos celulares como a produção de matriz extracelular, regulação da miogênese, resposta imune, angiogênese e embriogênese. Experimentos com células epiteliais de pulmão de mink deficientes nos receptores para TGF β demonstraram que o *T. cruzi* é incapaz de infectar essas células (Ming *et al.* 1995).

Moléculas de superfície do parasita são reconhecidas por um tipo específico de receptor, os receptores do tipo Toll (TLRs) presentes nas células do hospedeiro. Os TLRs são receptores transmembrana do tipo 1 com domínio extracelular com repetições de leucina e uma cauda intracelular carboxi-terminal que contém uma região conservada denominada domínio de homologia Toll/receptor interleucina 1 (TIR). O domínio extracelular é responsável pelo reconhecimento do ligante e pelo processo de dimerização dos receptores, fundamental para sua ativação (Wyllie *et al.*, 2000). Até o momento 10 TLRs foram descobertos nas células de mamíferos (Muzio *et al.*, 2000). Esses receptores atuam na resposta imune inata e são parte de um grupo específico de receptores denominados receptores de reconhecimento de padrão (PPRs). Os PPRs reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Um PAMP é uma molécula altamente conservada que é expressa por uma classe de microorganismos e não é expressa pelas células hospedeiras (Campos & Gazzinelli, 2004).

Cardiomiócitos de ratos neonatos expressam TLR2, TLR3, TLR4 e TLR6 (Frantz *et al.*, 1999). O TLR2 é responsável pelo reconhecimento das âncoras de glicofosfatidilinositol derivadas de *T. cruzi*, sendo sua dimerização com TLR6 ou TLR1 fundamental para sua ativação (Ozinsky *et al.* 2000; Campos *et al.*, 2001). A ligação com TLR 2 ativa cascata transdução sinal que promoverá a ativação do fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e consequentemente resposta celular pró-inflamatória (Gazzinelli *et al.*, 2001). A ativação de NF- $\kappa\beta$ promove transcrição de citocinas pro-inflamatórias, como

TNF- α (fator de necrose tumoral), IL-12(Interleucina 12), IL-1 β (Interleucina 1 β), IL-6 (Interleucina 6) e da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2), responsável pela produção de óxido nítrico - NO (Campos *et al.*, 2001).

A maioria dos efeitos desencadeados pelas citocinas referidas anteriormente relacionam-se com a proteção do hospedeiro contra o patógeno invasor. Entretanto, sua produção excessiva pode agravar a patologia e levar o hospedeiro à morte (Titus *et al.*, 1991). TNF- α é secretada por macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T, células natural “killers” (NK) e cardiomiócitos após estimulação. A síntese de TNF- α é induzida por diferentes estímulos incluindo Interferon (IFN), IL-12, bradicinina e complexos imunes, e inibidos por IL-6 e TGF- β . TNF- α , IL-1 β e IL-6 regulam, sinergicamente, suas produções através de mecanismos parácrinos e autócrinos (Chandrasekar *et al.*, 1998; COPE, 1999).

O TNF- α possui um amplo espectro de atividades incluindo-se: ação citolítica e citostática em células tumorais, aumento da fagocitose e citotoxicidade em neutrófilos, inibição de mecanismos anticoagulatórios, ação quimiotática em neutrófilos, indução de síntese de várias citocinas quimioatrativas, estimulação de angiogênese, indução de síntese de IL-1 e fagocitose em macrófagos, estimulação de síntese de NO e síntese de IFN- γ (interferon gama) por leucócitos (COPE, 1999). A IL-1 é produzida por diferentes tipos celulares, como macrófagos, queratinócitos e células endoteliais. Pode atuar ativando linfócitos, induzindo a síntese de TNF- α , IL-6, anticorpos, NO e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi/NOS2). Essa citocina também induz hipertrofia de certos tipos celulares (Titus *et al.*, 1991; Tsujino *et al.*, 1994; Petersen & Burleigh, 2003).

O NO é sintetizado pela oxidação da L-arginina em L-citrulina, catalizada pela enzima NOS. São conhecidas três isoformas de NOS. A NOS2 ou induzida é independente de cálcio e capaz de produzir grandes quantidades de NO. As outras duas isoformas, dependentes de cálcio e expressas constitutivamente, incluem a NOS neuronal (NOS1) e a NOS endotelial (NOS3). NOS1 e NOS3 produzem menores quantidades de NO e estão mais relacionadas com homeostase do sistema vascular (Shindo *et al.*, 1995; Chandrasekar *et al.*, 2000).

A síntese de NOS2 é induzida após certos estímulos como endotoxinas e TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (Chandrasekar *et al.*, 2000). O NO é a principal molécula com atividade tripanocida na infecção por *T. cruzi*, entretanto altos níveis de NO podem ser danosos para células e tecidos.

Existe uma grande diferença entre as populações de *T. cruzi* quanto a sua virulência, capacidade patogênica e imunogênica (Plumas-Marty *et al.*, 1992; Neira *et al.*, 2002). Fatores celulares e moleculares do hospedeiro estão envolvidos na resistência à infecção por *T. cruzi* seja *in vivo* ou *in vitro*, destacando-se a produção de quimiocinas, citocinas e de NO (Vespa *et al.*, 1994; Silva, 1999; Villalta *et al.*, 1999; Scianni, 2001).

Estudos recentes (Oliveira, 2003) utilizando três populações diferentes de *T. cruzi* (cepa JG e clones CL-Brener e Col 1.7 G2) demonstraram ser o clone CL-Brener o de maior potencial indutor, em menor período de tempo, da produção de NO por macrófagos, *in vitro*. Todas as populações foram capazes de induzir a produção de TNF- α , sem diferenças entre elas no período de 48 horas, mas a cepa JG induziu maiores níveis ao longo de 24 horas. Nagib (2005) demonstrou, *in vivo*, que os níveis séricos de TNF- α de ratos adultos infectados com clone CL-Brener e com a cepa JG não apresentavam diferenças significativas ao longo da fase aguda, embora essas populações induzam diferentes padrões de miocardite.

Zhang e Tarleton (1996) e Huang *et al.* (1999) demonstraram que a infecção com *T. cruzi* promove aumento na expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e da molécula de adesão vascular celular 1 (VCAM-1) em cardiomiócitos.

Diferentes produtos microbianos, como glicofosfatidilinositois, podem ativar o fator- κ B de transcrição nuclear, que por sua vez, induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , e regula a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos cardiomiócitos (Collart *et al.*, 1990; Goldfeld *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1994; Kopp e Ghosh, 1995).

Machado *et al* (2000) demonstraram que cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* expressam mRNA para TNF- α , IL-1 β , iNOS e para as quimiocinas KC (quimiocina derivada de queratinócito), proteína inflamatória de macrófago (MIP)-2, CXCL-9 = Mig (monocina induzida por interferon- γ),

Crg-2 (cytokine responsive gene 2), CCL-5 (ligante tipo 5 de quimiocina = RANTES) e JE (\cong CCL-2, ligante tipo 2 de quimiocina = MCP-1).

Nosso grupo tem utilizado o rato Holtzman como modelo experimental para o estudo da tripanosomíase americana e esclarecimento da patogênese dessa lesão. Nosso grupo demonstrou a ocorrência de lesão de terminações nervosas autonômicas em diferentes órgãos, porém mais severa no coração (Machado *et al.*, 1975, Camargos *et al.*, 2002). Demonstrou-se que a infecção com 300.000 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* resulta em rarefação acentuada da inervação simpática cardíaca durante a fase aguda (Machado *et al.*, 1975), bem como redução acentuada das terminações nervosas parassimpáticas e de níveis de colina acetiltransferase (Machado *et al.*, 1979; Machado *et al.*, 1987). Paralelamente à desnervação cardíaca, estabelece-se processo inflamatório intenso e parasitismo acentuado de cardiomiócitos na fase aguda da infecção (Machado & Ribeiro, 1989). Na fase tardia, ocorre recuperação gradual do padrão de inervação simpática desse órgão (Machado *et al.*, 1978). A desnervação simpática independe da lesão dos corpos neuronais nos gânglios simpáticos cervicais; as terminações nervosas cardíacas são o alvo primário da lesão (Camargos & Machado, 1988; Camargos *et al.*, 1996). Demonstrou-se, também, que mesmo ratos adultos desenvolvem miocardite aguda com desnervação simpática, a despeito da parasitemia praticamente nula (Guerra *et al.*, 2001).

De modo interessante, demonstramos que a susceptibilidade de ratos Holtzman jovens à infecção depende da população de *T. cruzi*. As cepas ABC e Y e o clone CI-Brener são capazes de induzir miocardite aguda intensa e de curta duração e causam desnervação simpática acentuada, além de mortalidade de 33% (cepa Y) ou 100% (cepa ABC) dos animais. Por sua vez, a infecção com o clone Col 1.7G2 resulta em miocardite aguda branda e desnervação cardíaca discreta na fase aguda. Entretanto, a miocardite persiste na fase tardia da infecção e a mortalidade é baixa, ao contrário do observado com as cepas Y e ABC (Camargos *et al.*, 2000).

A infecção com a cepa JG resulta em miocardite aguda leve a moderada, persistente na fase tardia e em mortalidade nula. Mesmo a infecção com inóculos elevados da cepa JG resulta em desnervação

simpática cardíaca leve e moderada em, respectivamente, 33% e 25% dos animais ao final da fase aguda (Silva G.C. 1999).

Sabe-se que o sistema de complemento não tem papel relevante no processo de desnervação cardíaca (Machado *et al.*, 1994). Já a diminuição de células radio-sensíveis (linfócitos e granulócitos) na fase aguda da infecção experimental de ratos Holtzman não impede a lesão das terminações nervosas simpáticas, sugerindo que essas células não são essenciais nesse processo. A presença de numerosos macrófagos no coração e as altas taxas de parasitas circulantes sugerem a participação dessas células e/ou de fatores do parasita na lesão das terminações nervosas (Mello & Machado, 1998). Adicionalmente, a imunossupressão induzida por ciclofosfamida que elimina, também, monócitos circulantes, impede a desnervação simpática cardíaca na fase aguda (Guerra *et al.*, 2001).

A quantificação da população de macrófagos residentes (ED2⁺) e de macrófagos recrutados do sangue (ED1⁺) no coração de ratos infectados com duas diferentes populações de *T. cruzi* – cepas Y e JG – apontam para a participação de macrófagos ED1⁺ no fenômeno de desnervação cardíaca na fase aguda da infecção chagásica.

Outro aspecto abordado em nosso estudo refere-se à produção de neurotrofinas, particularmente NGF (Nerve Growth Factor), por cardiomiócitos na infecção chagásica experimental. As neurotrofinas são polipeptídeos que desempenham importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico, tanto *in vivo* quanto em cultura de células, promovendo diferenciação de diferentes classes de neurônios (Halegoua *et al.*, 1991). Admite-se que possam também atuar como quimiotáticos para crescimento axonal (Paves & Saarma, 1997) embora outros fatores neurotróficos possam atuar como estimulantes ou inibidores de cones de crescimento de diferentes populações de neurônios. Até o momento, quatro neurotrofinas foram descritas em mamíferos: fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), Neurotrofina 3 (NT-3) e neurotrofina 4/5 (NT-4/5). As neurotrofinas atuam através da ligação a receptores específicos do tipo tirosina kinase, conhecidos como trks. NGF se liga com maior afinidade ao trkA, BDNF e NT-4/5 ativam trkB e NT-3 é o ligante de trkC, sendo

também capaz de se ligar com menor afinidade aos trkA e trkB. Além disso, todas as neurotrofinas são capazes de se ligar a outro tipo de receptor, o p75. O receptor p75 pertence à família dos receptores do TNF e se liga com menor afinidade a todas as neurotrofinas. A ligação de NGF com p75 é capaz de ativar fator transcrição NF- κ B e sua função não está relacionada com as dos receptores trk (Hiltunen *et al.* 1996) (Fig. 2). O NGF é liberado pelos órgãos/tecidos inervados em direção ao corpo celular do neurônio através de um mecanismo de transporte axonal retrógrado (Furukawa *et al.* 1984). Wheeler *et al.* (1998) demonstraram que receptor específico para NGF, trkA, é expresso *in vivo* em mioblastos de ratos adultos e em desenvolvimento.

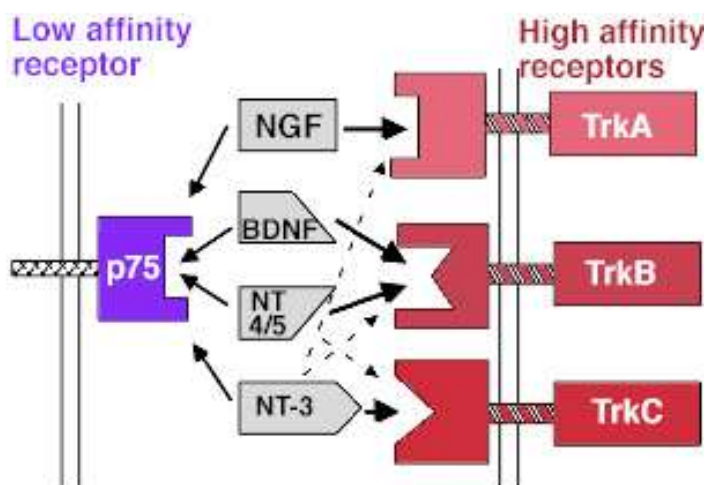


Fig. 2: Neurotrofinas e seus respectivos receptores

O NGF é necessário para sobrevivência, crescimento e diferenciação de neurônios simpáticos em fase do desenvolvimento em que essas células expressam tanto fenótipo colinérgico quanto adrenérgico (Chun & Patterson, 1977b; 1977c). *In vitro*, há controvérsia sobre a necessidade de NGF para a sobrevivência neuronal, mas, sem dúvida, o crescimento de neuritos depende desse fator (Oriike *et al.*, 2001). Quando co-cultivados com células cardíacas, os neurônios simpáticos sobrevivem na ausência de NGF, sendo essa sobrevivência maior em culturas com alta densidade de células (Chun & Patterson, 1977a). É provável que cardiomiócitos produzam NGF ou substância com função semelhante; o meio condicionado por essas células mantém neurônios viáveis em cultura (Wakade & Bhave, 1988). Tem sido

sugerido que o NGF promove neurotransmissão simpática aumentando o número de fibras simpáticas que estabelecem contato com a célula-alvo (Rush *et al.*, 1997; Lockhart *et al.*, 2000). Além disso, alterações de desenvolvimento em cardiomiócitos levam ao aumento na densidade de vesículas sinápticas com varicosidades ao longo das fibras simpáticas, um processo regulado por NGF. Portanto, assim que os cardiomiócitos se tornam maduros, eles produzem fatores que promovem a formação de estruturas pré-sinápticas simpáticas (Lockhart *et al.*, 2000).

Na infecção experimental de ratos com cepa Y de *T. cruzi* ocorre aumento acentuado dos níveis cardíacos de NGF durante a fase aguda, período no qual as terminações noradrenérgicas encontram-se lesadas (Martinelli *et al.*, 2006). Na fase crônica, quando ocorre regeneração das terminações noradrenérgicas, os níveis dessa neurotrofina reduzem-se significativamente. Consideramos importante ressaltar que na fase aguda a desnervação simpática é acompanhada de miocardite com predomínio de macrófagos. A participação de macrófagos ou de cardiomiócitos na síntese dessa neurotrofina durante a fase aguda da infecção não está clara. Em nosso modelo de cultivo de cardiomiócitos esse aspecto poderá ser esclarecido.



2. OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo visa compreender melhor alguns aspectos relativos à interação do *T. cruzi* com cardiomiócitos. Pretende-se analisar, *in vitro*, a produção de óxido nítrico, citocinas e do fator de crescimento neural por cardiomiócitos infectados com diferentes populações de *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

Usando-se infecções com cepa Y ou com o clone CL-Brener pretende-se avaliar, em cardiomiócitos:

- A) a produção de óxido nítrico (NO);
- B) a produção de TNF- α e IL-1 β ;
- C) a produção de NGF.

3.METODOLOGIA

3 Metodologia

3.1. Isolamento e preparação da cultura de cardiomiócitos

Para o estabelecimento da cultura de cardiomiócitos, utilizaram-se ratos Holtzman neonatos (1-5 dias de idade) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG.

Os procedimentos experimentais basearam-se na metodologia proposta por Chlopcikova *et al.* (2001). Os animais foram sacrificados por decapitação e os corações foram removidos e coletados em tampão salina fosfatado (PBS) sem cálcio e magnésio e sob oxigenação constante. Para dissociação dos cardiomiócitos utilizou-se solução de tripsina EDTA 0,25% (Gibco). O processo de digestão enzimática foi repetido cinco vezes com 20 minutos cada. Após a dissociação, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, a 37^oC. Os sedimentos (pellets) foram ressuspensos em soro fetal bovino (SFB) e submetidos à nova centrifugação. O pellet resultante foi ressuspensado em meio DMEM+M199 (Sigma) (4:1) suplementado com 10% de soro fetal de cavalo, 5% SFB, 1% gentamicina e 1% glutamina. As células foram incubadas em garrafas de cultura (25cm²) por 2 horas para adesão de fibroblastos. Após esse período de tempo o meio livre de fibroblastos foi coletado e uma alíquota retirada para contagem do número de células, em câmara de Neubauer. Para isso, as células foram coradas com solução de azul de Tripán. Os cardiomiócitos foram plaqueados em placas de 24 poços na concentração mínima de 1 X 10⁵ células/poço. As células foram mantidas em estufa com atmosfera úmida a 37^o C e 5% de gás carbônico (CO₂). Após 72 horas, trocou-se o meio por DMEM+M199 (4:1) contendo 1% de gentamicina e 1% de glutamina, sem soro. As trocas de meio subsequentes foram realizadas a cada 48 horas ou de acordo com os procedimentos experimentais, mas sempre com meio sem soro.

3.2. Obtenção do *T.cruzi*

As formas tripomastigotas da cepa Y de *T.cruzi* foram obtidas do sangue colhido do plexo orbital de camundongos infectados, fornecidos pelo

Prof. Egler Chiari do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. O sangue foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, reservando-se o plasma para separação dos parasitas. A linhagem de fibroblastos de rim de macaco (LLC-MK2) mantida em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 1% glutamina e 1% penicilina-estreptomicina foi infectada para manutenção dos parasitas em cultura. Após infecção, o meio das células LLC-MK2 foi substituído por DMEM suplementado com 2% SFB, 1% glutamina e 1% penicilina-estreptomicina. As células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada, a 37⁰ C e 5% de CO₂. Dois repiques foram feitos antes da utilização dos parasitas nos experimentos.

As formas tripomastigotas do clone CL-Brener foram obtidas de culturas de células VERO (células epiteliais de rim de macaco), fornecida pela Prof^a. Daniella C. Bartholomeu do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, e mantido em culturas de células LLC-MK2 nas mesmas condições da cepa Y.

3.3. Infecção de cardiomiócitos

Os cardiomiócitos mantidos em placas de 24 poços foram infectados com tripomastigotas de uma das duas populações de *T. cruzi* (3-5 parasitas/célula). Após intervalos, metanol foi colocado em cada poço para fixação por 30 segundos, seguindo-se coloração com Giemsa (1:20) por 20 minutos, para comprovação da infecção.

3.4. Visualização dos cardiomiócitos

Para acompanhamento da cultura de cardiomiócitos utilizou-se microscópio invertido Axiovert 25 Zeiss. Os cardiomiócitos foram caracterizados mediante a observação de contração espontânea, formação de sincício, coloração histoquímica de PAS e demonstração de miofibrilas por marcação com falotoxina fluorescente para actina F (Alexa Fluor 488, Molecular Probes).

A técnica do PAS permite a distinção entre células não musculares (PAS-) e musculares (PAS+), de acordo com Atherton *et al.*, (1986). Para

realização dessa técnica as células, diretamente nos poços, foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS (tampão salina fosfato) por 20 minutos, a 4^o C. Após lavagem rápida com PBS, as células foram incubadas com ácido periódico a 0,5% por 10 minutos. Lavou-se em água destilada por 5 minutos e em seguida as células foram incubadas com reativo de Schiff por 20 minutos. As células foram incubadas, por 1 minuto, com solução de bissulfito de sódio a 1%, e em seguida lavadas com água. Para melhor visualização, realizamos a contra coloração dos núcleos com hematoxilina.

Para visualização de miofibrilas, os cardiomiócitos foram cultivados em lamínulas Thermanox, fixadas com solução de paraformaldeído a 4% em PBS por 20 minutos, a 4^o C. Em seguida, procedeu-se a incubação em solução de Triton X-100 a 0,1% em PBS, durante 10 minutos, para permeabilização dos cardiomiócitos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com solução de albumina sérica bovina (BSA) a 1% em PBS, por 30 minutos. Incubaram-se novamente as células com solução de Triton X-100 por 5 minutos. Os cardiomiócitos foram, então, incubados com Faloidina diluída (1:4) em PBS-BSA 1% durante 20 minutos, lavados 2 vezes e visualizados em microscópio confocal META 510 Zeiss.

3.5. Dosagens em sobrenadantes de culturas

Sobrenadantes da cultura de cardiomiócitos infectados ou não foram coletados em diferentes intervalos de tempo para dosagem de NO, de citocinas e de NGF. Todas as dosagens foram realizadas em duplicatas.

3.5.1. Dosagem de nitrito

Para dosagem de nitrito utilizou-se solução de Griess (Green *et al.*, 1981), constituída de solução de sulfanilamida (Sigma) a 1% e solução de naftilenodiamida (Sigma) a 0.1%, na proporção de 1:1, ambas em ácido fosfórico 2.5% (Merck). Para dosagem, 50µL de sobrenadante foi adicionado à placa "Nunc Maxsorb", seguido de 50µL de solução de Griess. Após 5 minutos, foi realizada a leitura da reação colorimétrica com absorbância em 550 nm, em

leitor Versamax™, “Molecular Devices”. A concentração de nitrito foi determinada em referência à curva padrão de 0,5mM a 4µM de NaNO₂.

3.5.2. Dosagem de TNF-α

Utilizou-se o método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), seguindo-se o protocolo da Pharmingen (San Diego, USA) para TNF-α de rato. Após sensibilização com anticorpo de captura (diluição 1:250) em tampão carbonato, a 4°C, durante uma noite, procedeu-se a incubação com Tween 20 a 0,05% em tampão de diluição (PBS e soro fetal bovino a 10%, Merck), por uma hora. A seguir, as placas foram lavadas com solução de Tween 20 e adicionado 100µL de sobrenadante. Em cada placa, diferentes diluições de TNF-α foram usadas para a curva padrão, com valor máximo de 2000pg/ml e mínimo de 0, além do uso de poços controles sem adição de amostras.. A incubação foi feita a temperatura ambiente por 2 horas. Após lavagem, adicionou-se anticorpo anti-TNF-α. biotilado (1:250 em tampão diluição), incubando-se por uma hora à temperatura ambiente. A seguir, adicionaram-se estreptovidina (1:250) diluída em tampão de diluição, por 30 minutos, a temperatura ambiente e solução substrato (Tetrametilbenzidina - TMB) por 30 minutos, no escuro, para revelação da atividade peroxidásica. A reação foi bloqueada com 50µL de H₂SO₄ 2N. A leitura da placa foi realizada a 450nm (Versamax™, Molecular Devices) e os valores analisados no programa SOFTmax Pro versão3.1.1. Todas as soluções foram preparadas com água estéril (18MΩ) obtida no purificador ELGASTAT Máxima.

3.5.3. Dosagem de IL-1β

Os níveis de IL-1 β foram obtidos pelo método ELISA sanduíche, de acordo com protocolo da R&D Systems. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura na concentração de 0,8 µg/ml diluído em PBS estéril e incubadas, por uma noite, a temperatura ambiente. Lavou-se a placa com PBS contendo 0,05% Tween 20. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com solução de BSA a 1% em PBS, por 1 hora. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras (sobrenadantes) foram

adicionadas e incubadas por duas horas. Lavou-se novamente a placa e procedeu-se à incubação com anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 350 ng/ml diluído em PBS-BSA 1% por 2 horas. Lavou-se novamente a placa. A seguir realizou-se incubação com estreptavidina conjugada a peroxidase (1:200 em PBS-BSA) por 30 minutos visando a amplificação do sinal, revelado pela adição de substrato para a peroxidase, composto de uma mistura 1:1 do Reagente de cor A (H_2O_2) e Reagente de cor B (Tetrametilbenzidina) da “R&D System” durante 30 minutos. A reação foi bloqueada com 50 μ L de H_2SO_4 2N. A leitura dos resultados foi realizada no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices), com comprimento de onda de 450nm e os valores analisados no programa SOFTmax Pro versão 3.1.1. Para cada placa, construiu-se uma curva de calibração da proteína quantificada conforme o protocolo, além do uso de poços controles sem adição de amostras. A curva de calibração possui um valor máximo de 4000 pg/ml e mínimo de 0.

3.5.4. Dosagem de NGF

Os níveis de NGF foram obtidos pelo método ELISA sanduíche, de acordo com protocolo da “R&D Systems”. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura na concentração de 0,4 μ g/ml diluído em PBS estéril e incubadas, por uma noite, a temperatura ambiente. Lavou-se a placa com PBS contendo 0,05% Tween 20. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com PBS/BSA 1%, por 1 hora. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as amostras (sobrenadantes) foram adicionadas e incubadas por duas horas. Lavou-se novamente a placa. Adicionou-se anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de 100 ng/ml diluído em PBS-BSA 1%, incubando-se por 2 horas. Lavou-se novamente a placa. A seguir incubou-se com estreptavidina conjugada a peroxidase (1:200 em PBS-BSA) por 30 minutos visando a amplificação do sinal, revelado pela adição de substrato para a peroxidase, composto de uma mistura 1:1 do Reagente de cor A (H_2O_2) e Reagente de cor B (Tetrametilbenzidina) da “R&D System” durante 30 minutos. A reação será bloqueada com 50 μ L de H_2SO_4 2N. A leitura dos

resultados foi feita no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices), com comprimento de onda de 450nm e os valores analisados no programa SOFTmax Pro versão 3.1.1. Para cada placa, foi realizada uma curva de calibração da proteína quantificada conforme o protocolo, além do uso de poços controles sem adição de amostras. A curva de calibração possui um valor máximo de 1000 pg/ml e mínimo de 0.

3.6. Análise estatística e confecção dos gráficos

Para análise estatística foi utilizado o programa “GraphPad Prism” versão 3.00 (GraphPad Software Incorporated) aplicando-se o teste t de *student* com significância em 5%.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Morfologia de cardiomiócitos

Nas primeiras 48 horas de cultura, os cardiomiócitos exibiam forma arredondada, na maioria, não aderidos à placa. No 3º dia de cultura os cardiomiócitos apresentavam diferentes formas e exibiam contração regular e espontânea. A maioria das células apresentava projeções do citoplasma (Fig. 3), irregulares que se conectavam com as células vizinhas formando um sincício com contração simultânea. Algumas células podiam não apresentar contração espontânea. As culturas não infectadas sobreviviam por, aproximadamente, 14 dias, quando começavam a degenerar por processo de apoptose. Observou-se que o tempo de sobrevivência era diretamente proporcional a densidade celular. Alguns dos cardiomiócitos apresentavam-se binucleados, característica desse tipo celular. (Fig 3).

Além da contração espontânea, os cardiomiócitos apresentavam citoplasma positivo ao PAS e com miofibrilas coradas por falotoxinas para actina (Fig. 4). Todas as culturas utilizadas neste trabalho possuíam a concentração de $4,5 \times 10^5$ células por poço.

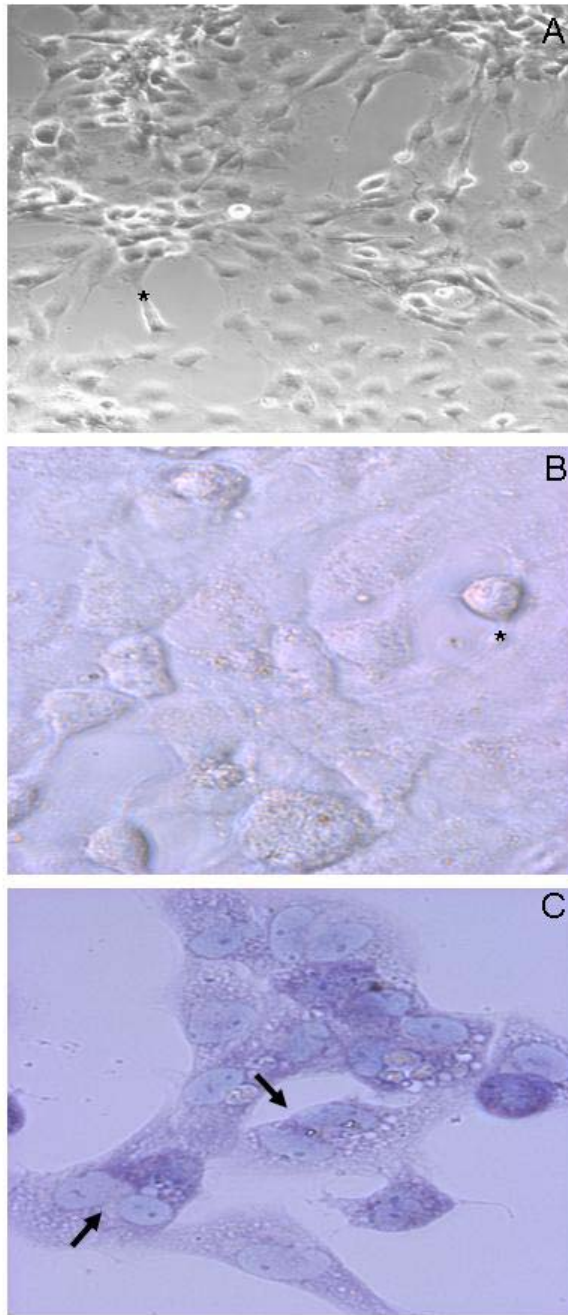


FIGURA 3: Cardiomiócitos não infectados aos 9 dias de cultivo em meio DMEM + M199. Observa-se aspecto em sincício, em que os cardiomiócitos conectam-se por projeções citoplasmáticas (A e B, *). Contraste de fase, 100X em (A) e 200X em (B). C) Cardiomiócitos binucleados (seta). Coloração Giemsa. 200X.

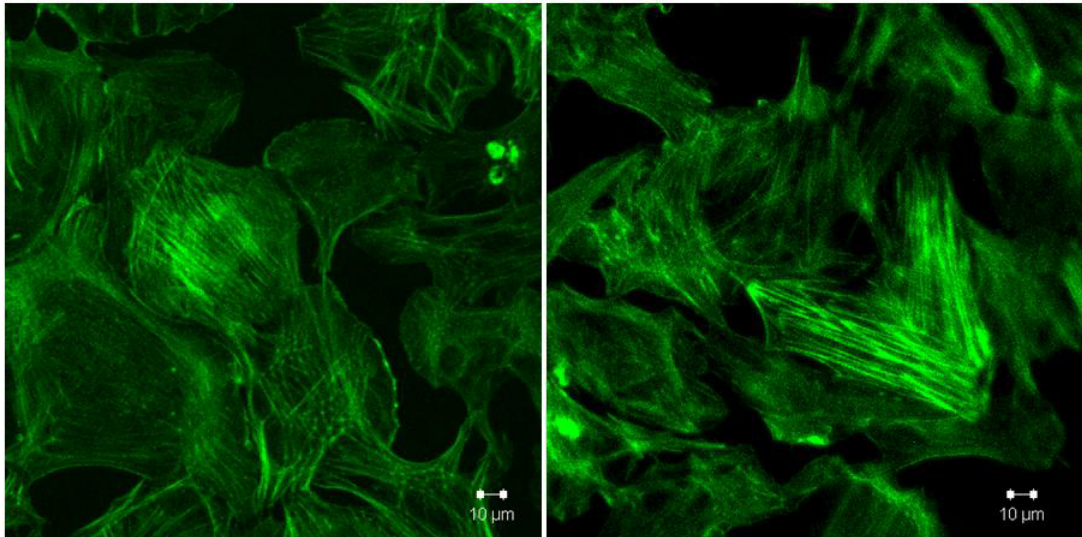


FIGURA 4: Cardiomiócitos não infectados aos 5 dias de cultivo em meio DMEM + M199.

A e B) Observam-se cardiomiócitos com miofibrilas marcados com falotoxina para actina F. As miofibrilas dispõem-se, em sua maioria, ao longo do maior eixo da célula.

4.2. Morfologia de cardiomiócitos infectados com a cepa Y ou com o clone CL-Brener de *Trypanosoma cruzi*.

Na infecção com a cepa Y, ocorria, a partir do 1º dia, desagregação do sincício, formando-se aglomerados de células unidos por projeções citoplasmáticas. A grande maioria das células não resistiu à infecção, morrendo por apoptose e soltando-se da placa de cultura. O número de células diminuiu após a infecção, mas permanece constante nos 3 primeiros dias de infecção, período que estudamos nesse trabalho. O experimento foi interrompido quando a densidade celular foi alterada, ou seja, no 3º dia de infecção. As células que permaneciam vivas apresentavam o citoplasma repleto de amastigotas, em média, 30 amastigotas por célula (Fig. 5)

Já a infecção com o clone CL-Brener (Fig. 6) também resultou em morte de cardiomiócitos, por apoptose. Entretanto, em menor proporção que a infecção com a cepa Y. As células que permaneciam vivas apresentavam, em média, 20 amastigotas.

FIGURA 5: Cardiomiócitos aos 9 dias de cultivo, infectados ou não, com a cepa Y, em meio DMEM + M199:

- A) Cardiomiócitos não infectados formando sincício. Contraste de fase, 100X.
- B) Cardiomiócitos com 3 dias de infecção. Note a destruição do sincício e os grupos de células unidas por projeções citoplasmáticas. Contraste de fase, 100X.
- C) Cardiomiócitos não infectados formando sincício. Contraste de fase, 200X.
- D) Cardiomiócitos com 3 dias de infecção. Note a destruição do sincício e as amastigotas no citoplasma da célula (setas pretas). Contraste de fase, 200X.
- E) Cardiomiócitos não infectados. Observe as células se unindo por projeções do citoplasma (*). Giemsa, 200X.
- F) Cardiomiócitos com 3 dias infecção. Note os citoplasmas celulares repletos de amastigotas e as células com membrana rompida (seta vazia). Giemsa, 200X.

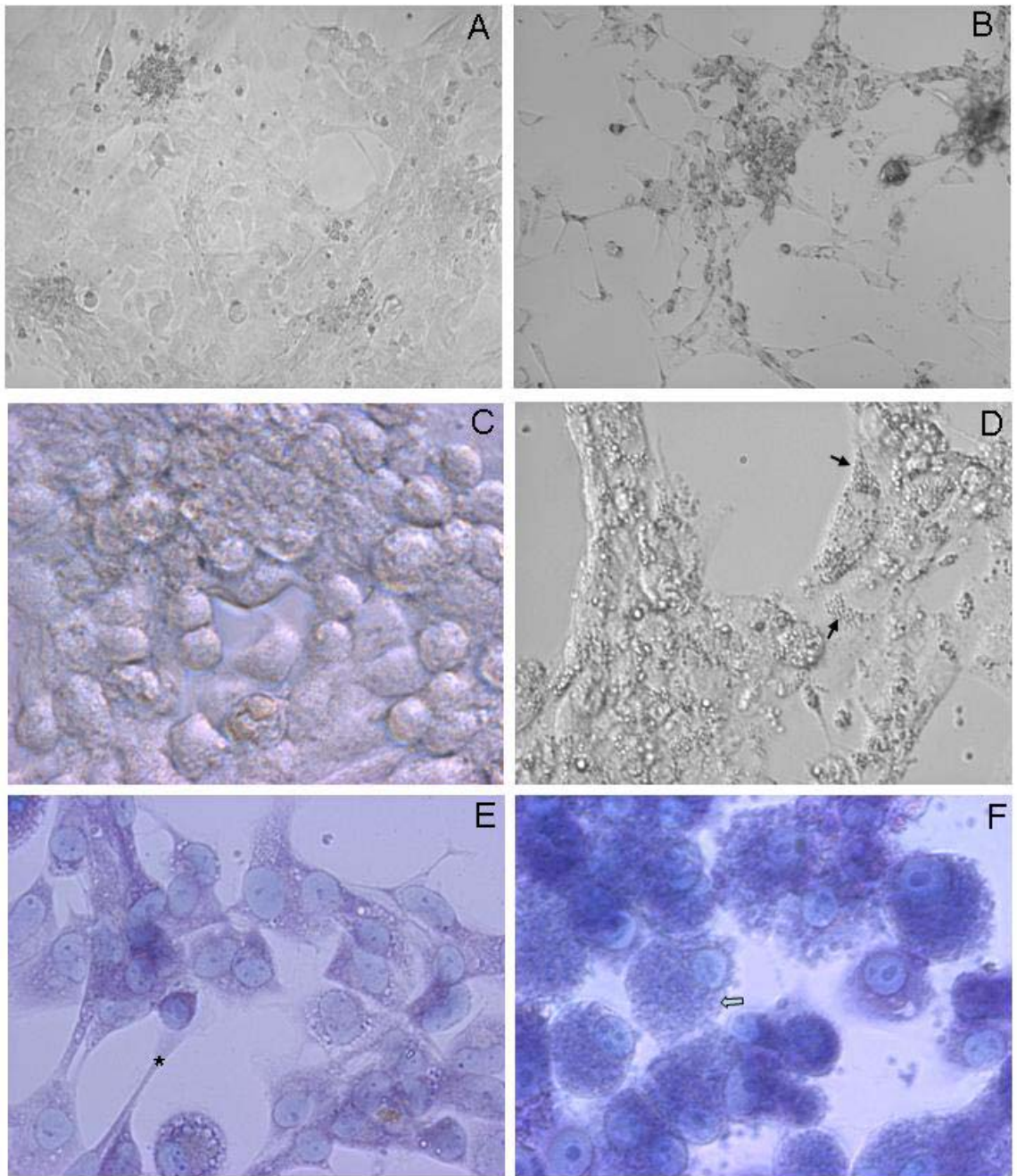


FIGURA 5

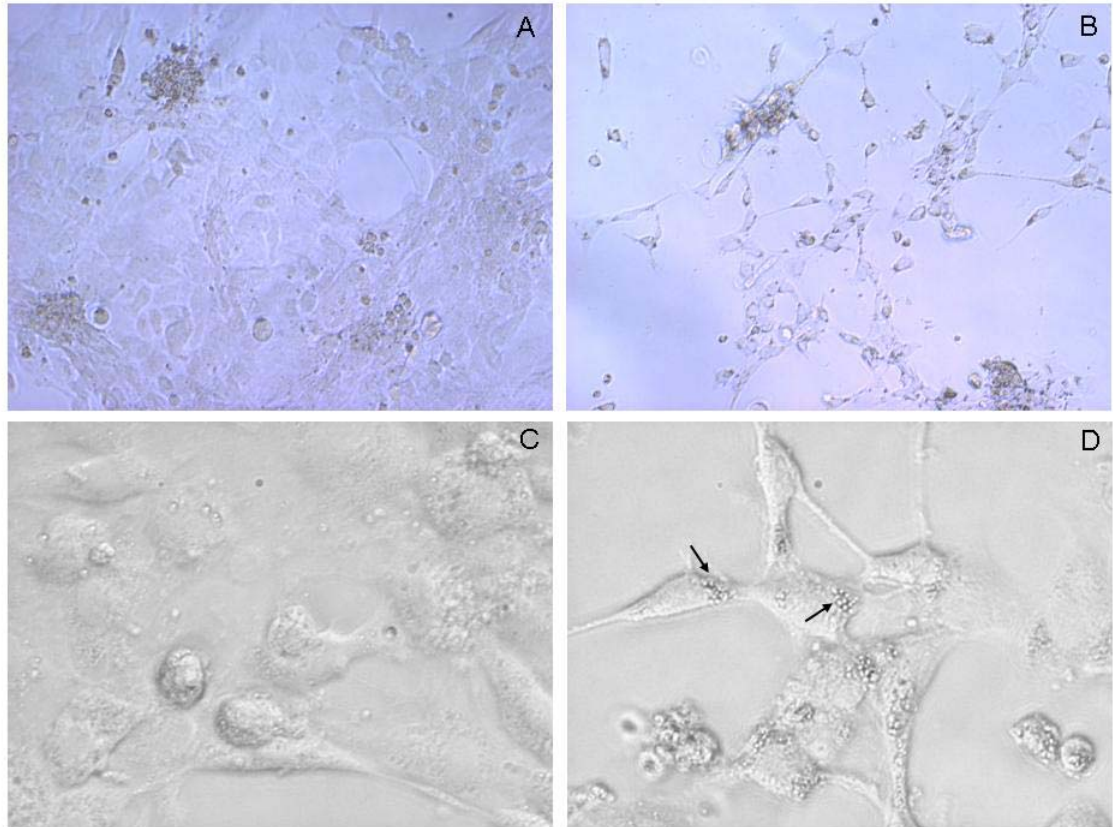


FIGURA 6: Cardiomiócitos aos 9 dias de cultivo, infectados ou não, com o clone CL-Brener em meio DMEM + M199:

- A) Cardiomiócitos não infectados formando sincício. Contraste de fase, 100X.
- B) Cardiomiócitos com 3 dias de infecção. Note a destruição do sincício e os agrupamentos de células unidas por projeções citoplasmáticas. Contraste de fase, 100X.
- C) Cardiomiócitos não infectadas formando sincício. Contraste de fase, 200X.
- D) Cardiomiócitos com 3 dias de infecção. Note a destruição do sincício e o menor número de amastigotas, quando comparado com a cepa Y (setas pretas). Contraste de fase, 200X.

4.3 Níveis de nitrito em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de *T.cruzi*.

Em culturas de cardiomiócitos não infectadas não foi possível detectar NO no sobrenadante.

Ambas as populações de *T. cruzi* foram capazes de induzir a produção de NO por cardiomiócitos na ausência de estímulo prévio por citocinas. Já foi possível detectar diferenças entre os isolados de *T.cruzi*, a partir do 1º dia de infecção.

A cepa Y induziu a produção de NO somente no primeiro dia de infecção ($0,006 \pm 0,002 \mu\text{M}$), retornando a níveis não detectáveis no 2º e 3º dias de infecção (GRAF 1A).

O clone CL-Brener induziu a produção de NO no 1º ($0,040 \pm 0,003 \mu\text{M}$) e 2º ($0,017 \pm 0,002 \mu\text{M}$) dias de infecção, sendo os níveis do 2º dia superiores ao 1º. No 3º dia de infecção pelo clone CL-Brener, os níveis de nitrito foram indetectáveis (GRAF 1B). Os níveis de NO induzidos pelo clone CL-Brener foram significativamente maiores que os induzidos pela cepa Y nos dois primeiros dias de infecção (GRAF 1C).

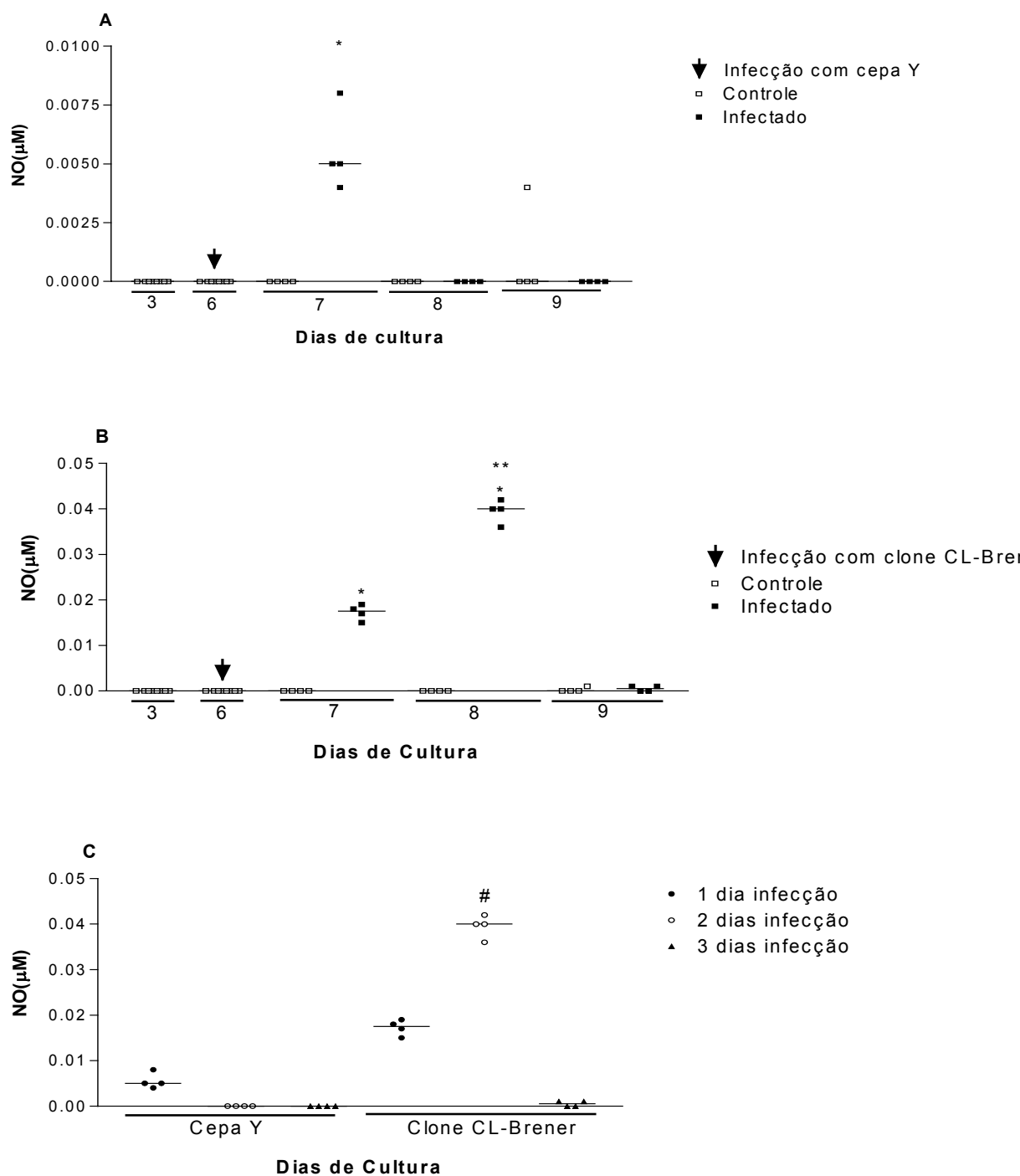


GRÁFICO 1 – Produção de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por *T. cruzi*. (A) – cepa Y, (B) – clone CL-Brener e (C) comparação entre os dois isolados, $p < 0,05$.

* (infectado X respectivo controle)

** (1 dia X 2 dias infecção)

(1 e 2 dias infecção CL-Brener X 1 dia infecção Y)

4.4 Níveis de TNF- α em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de *T.cruzi*.

Em culturas de cardiomiócitos não infectadas, os níveis de TNF- α foram indetectáveis ou próximos de zero.

Ambas as populações de *T. cruzi* foram capazes de induzir a produção de TNF- α por cardiomiócitos na ausência de estímulo prévio por outras citocinas. Diferenças entre os isolados na produção de TNF- α foram observadas no 1^o dia de infecção.

A cepa Y induziu a produção de TNF- α no primeiro dia de infecção ($693,796 \pm 99,552$ pg/ml), retornando a níveis não detectáveis ou próximos de zero no 2^o e 3^o dias de infecção (GRAF 2A).

O clone CL-Brener também induziu a produção de TNF- α no 1^o dia ($60,592 \pm 45,385$ pg/ml). No 2^o e 3^o dias de infecção pelo clone CL-Brener, os níveis de TNF- α foram indetectáveis (GRAF 2B).

Os níveis de TNF- α induzidos pela cepa Y foram significativamente maiores que os induzidos pelo clone CL-Brener no primeiro dia de infecção ($693,796 \pm 99,552$ X $60,592 \pm 45,385$ pg/ml) (GRAF 2C).

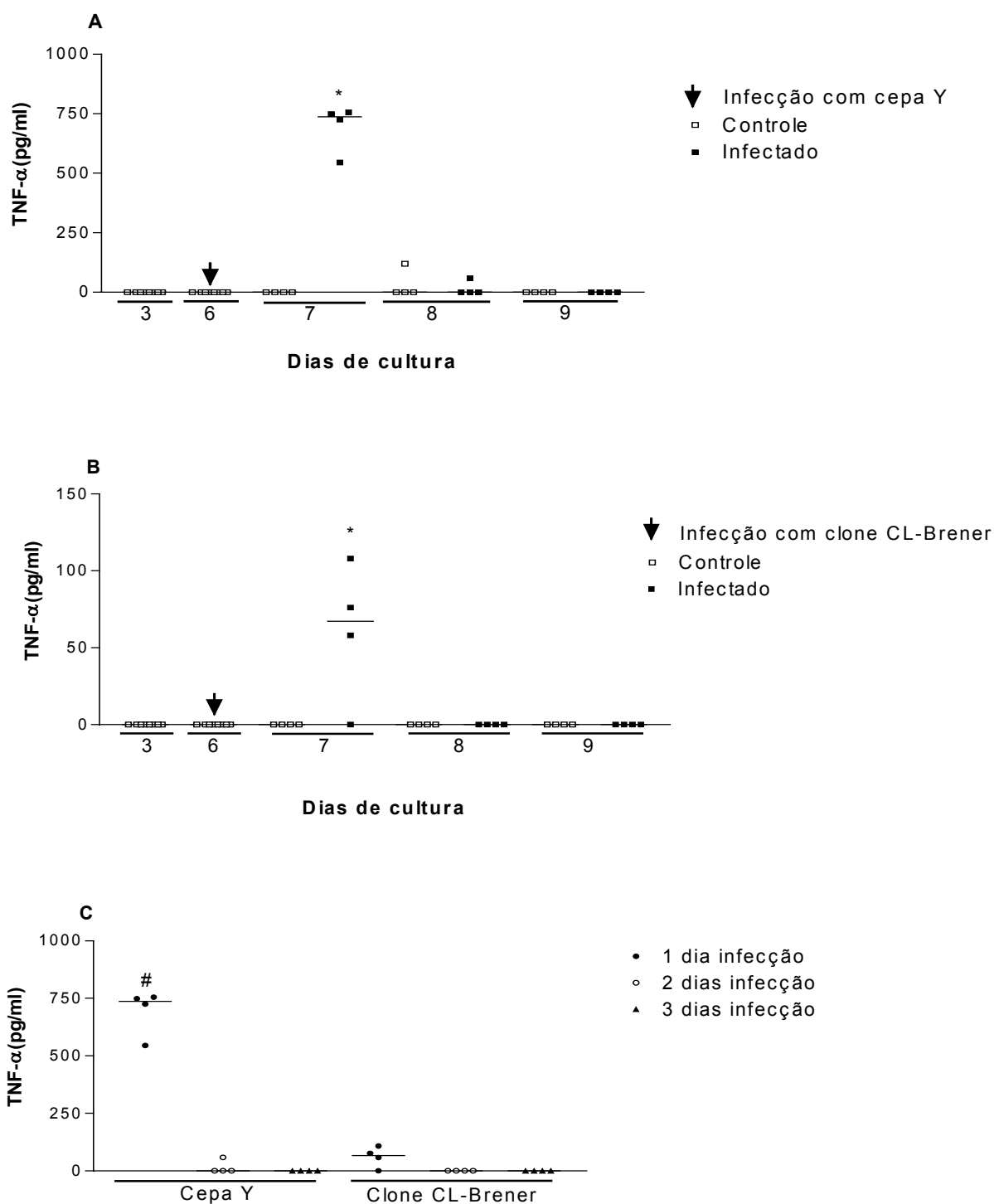


GRÁFICO 2 – Produção de TNF- α em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por *T. cruzi*. (A) – cepa Y, (B) – clone CL-Brener e (C) comparação entre os dois isolados, $p < 0,05$.

* (infectado X respectivo controle)

(1 dia cepa Y X 1 dia infecção CL-Brener)

4.5. Níveis de IL-1 β em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de *T.cruzi*.

Em culturas de cardiomiócitos não infectadas, os níveis de IL-1 β foram indetectáveis ou próximos de zero.

Tanto a cepa Y quanto o clone CL-Brener foram capazes de induzir a produção de IL-1 β por cardiomiócitos na ausência de estímulo prévio por outras citocinas. Diferenças entre os isolados na produção de IL-1 β foram observadas no 1^o dia de infecção.

A cepa Y induziu a produção de IL-1 β no 1^o (638,277 \pm 274,370 pg/ml) e no 2^o (75,896 \pm 52,378 pg/ml) dias de infecção sendo este último sem diferença significativa em relação ao controle (124,630 \pm 119,110 pg/ml). No 3^o dia de infecção os níveis de IL-1 β retornaram a valores indetectáveis (GRAF 3A).

O clone CL-Brener também induziu a produção de IL-1 β no 1^o (364,005 \pm 47,473 pg/ml). No 2^o e 3^o dias de infecção pelo clone CL-Brener, os níveis de IL-1 β foram indetectáveis (GRAF 3B).

Os níveis de IL-1 β induzidos pela cepa Y mostraram-se semelhantes ao do clone CL-Brener, mas com tendência a valores mais elevados na infecção com a cepa Y, no primeiro dia de infecção (638,277 \pm 274,370 pg/ml X 364,005 \pm 47,473 pg/ml) (GRAF 3C).

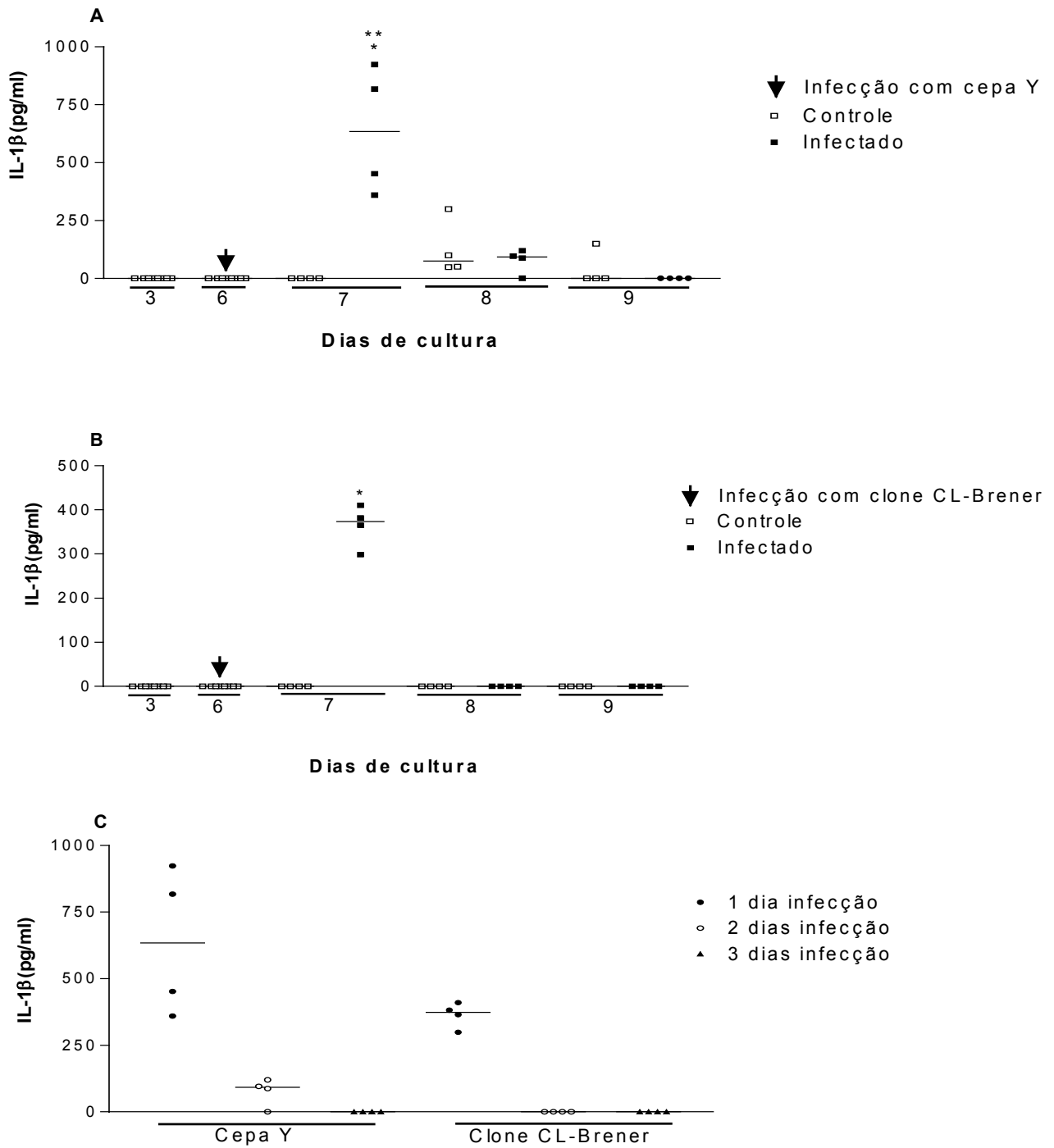


GRÁFICO 3 – Produção de IL-1 β em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por *T.cruzi*. (A) – cepa Y, (B) – clone CL-Brener e (C) comparação entre os dois isolados, $p < 0,05$.

* (infectado X respectivo controle)

** (1 dia X 2 dias infecção)

4.6. Níveis de NGF em sobrenadantes de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y e clone CL-Brener de *T. cruzi*.

Em culturas de cardiomiócitos não infectadas ocorre produção de NGF a partir do 3^o dia de cultura, em ambos os experimentos. Ambas as populações foram capazes de induzir a produção de NGF por cardiomiócitos na ausência de estímulo prévio por citocinas. Diferenças entre os isolados na produção de NGF foram observadas a partir do 1^o dia de infecção.

No experimento com a cepa Y, os níveis de NGF no 3^o e 6^o dia de cultura foram significativamente diferentes e, respectivamente, $17,171 \pm 1,293$ e $54,273 \pm 5,021$ pg/ml. A cepa Y induziu a produção de NGF somente no primeiro dia de infecção ($454,668 \pm 72,424$ pg/ml), retornando a níveis não detectáveis no 2^o e 3^o dias de infecção (GRAF 4A).

No experimento com o clone CL-Brener, os níveis de NGF no 3^o e 6^o dia de cultura foram significativamente diferentes e, respectivamente, $18,119 \pm 2,253$ e $49,443 \pm 8,533$ pg/ml. O clone CL-Brener induziu a produção de NGF no 1^o e 2^o dias de infecção, sendo os níveis do 1^o dia superiores ao 2^o ($259,075 \pm 31,333$ X $52,409 \pm 8,721$ pg/ml). No 3^o dia de infecção pelo clone CL-Brener, os níveis de NGF foram próximos de zero (GRAF 4B).

Os níveis de NGF induzidos pela cepa Y foram significativamente maiores que os induzidos pelo clone CL-Brener no 1^o dia de infecção ($454,668 \pm 72,424$ X $259,075 \pm 31,333$). No 2^o dia de infecção, só o clone CL-Brener foi capaz de induzir a produção de NGF (GRAF 4C).

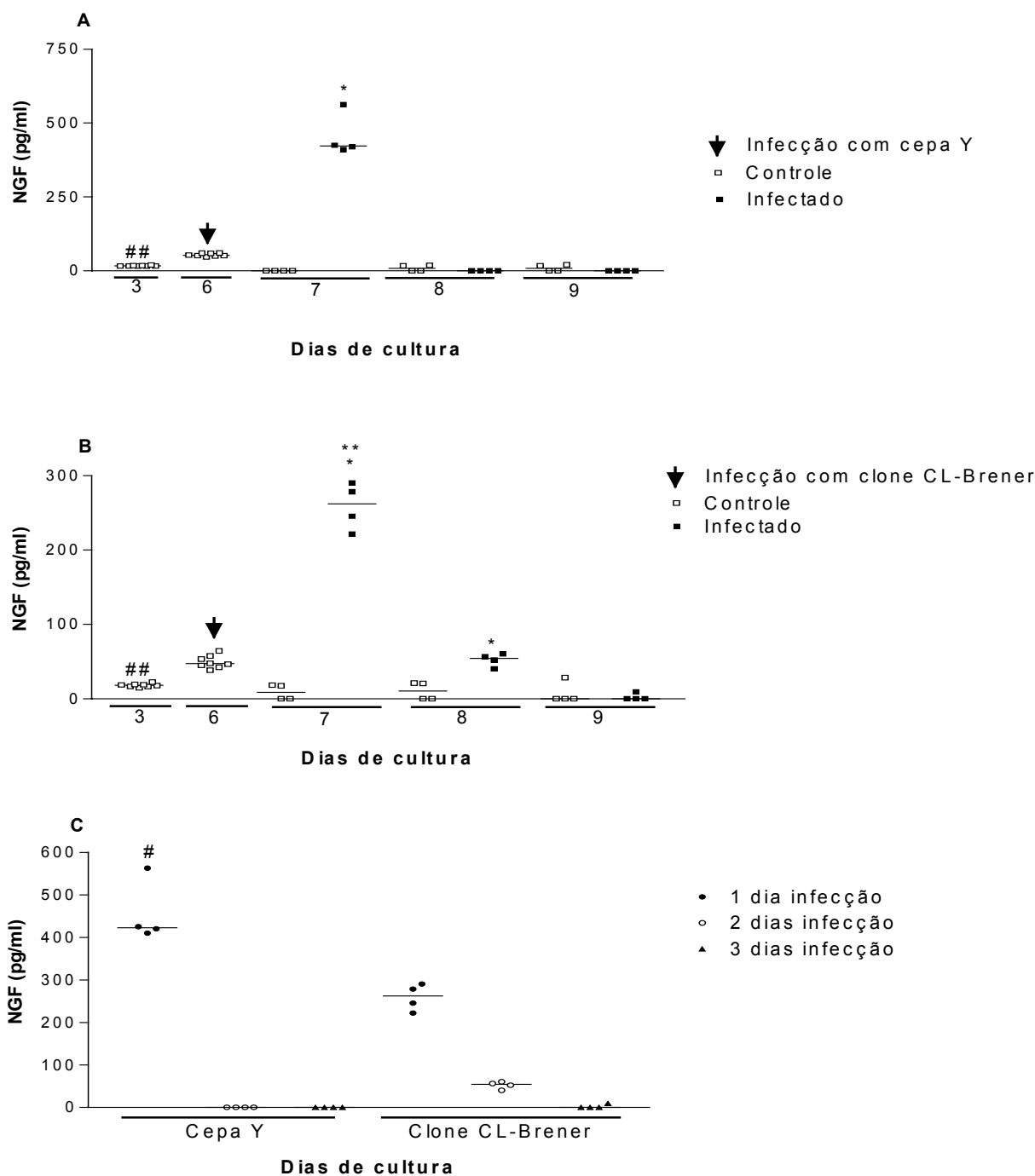


GRÁFICO 4 – Produção de fator neurotrófico (NGF) em sobrenadantes de cardiomiócitos de ratos infectados ou não por *T. cruzi*. (A) – cepa Y, (B) – clone CL-Brener e (C) comparação entre os dois isolados, $p < 0,05$.

* (infectado X respectivo controle)

** (1 dia X 2 dias infecção)

(1 dia infecção Y X 1 infecção CL-Brener)

##(3 dias X todos os outros dias)

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

O protocolo utilizado, em nosso laboratório, para cultura de cardiomiócitos possibilitou a viabilidade dessas células por, aproximadamente, 14 dias. No primeiro e segundo dias de cultura, os cardiomiócitos apresentavam, em sua maioria, forma arredondada.

Segundo Li (1996a), essa morfologia é característica de cardiomiócitos recém isolados e resulta da ruptura de sarcômeros durante o processo de isolamento. Sarcômeros intactos impedem a aderência dos cardiomiócitos e, conseqüentemente, seu crescimento *in vitro* (Li, 1996b). Após 24 horas em cultura, ocorre o rearranjo dos sarcômeros dos cardiomiócitos, alterando assim a morfologia da célula, que estando aderida, começa a hipertrofiar e a contrair espontaneamente, o que ocorre por volta do terceiro dia de cultura.

Em nossos experimentos, observamos que os cardiomiócitos emitiam projeções citoplasmáticas em direção à vizinhança, estabelecendo contato com as células vizinhas. Após a confluência, formavam um sincício que apresentava contração regular e espontânea. Essa característica, como já observado por Goldman & Wurzel (1992) e Li (1996b), indica a presença de junções do tipo *gap*. Algumas células podem não apresentar contração espontânea, mas são capazes de hipertrofia. Segundo Alberton *et al.* (1986), a ausência de contração é devido à ruptura do sarcômero no momento do isolamento e a incapacidade de alguns cardiomiócitos de regenerá-lo, apesar de possuírem proteínas contráteis.

Quanto maior a confluência celular, maior o tempo de sobrevivência da cultura. Clark *et al.* (1998) estudando culturas de cardiomiócitos adultos, ressaltaram a importância da manutenção dos contatos intercelulares e da contração espontânea na sobrevivência da cultura. A ausência de contatos intercelulares promove perda gradual da estrutura miofibrilar, o que acarreta perda da função contrátil. O número de contatos intercelulares em uma cultura é dependente do tamanho do miócito e da densidade de plaqueamento. Em culturas com baixa densidade celular, os miócitos apresentam distribuição esparsa, sem batimento e apresentam atrofia de miofibrilas.

Frequentemente, em nossos experimentos, observamos cardiomiócitos binucleados. Clubb & Bishop (1984) relatam que o desacoplamento entre cariocinese e citocinese, em cultura, resulta em cardiomiócitos com mais de um núcleo, já que estes continuam sintetizando DNA.

Em nossos experimentos, as características morfológicas – forma celular, contração espontânea – e histoquímicas – positividade ao PAS e à falotoxinas – confirmaram que a grande maioria das células em cultura era cardiomiócitos. O estabelecimento de um protocolo eficiente para estabelecimento de cultura de cardiomiócitos nos permitirá desenvolver outros projetos relacionados à interação *T. cruzi* - cardiomiócitos.

Pereira *et al.* (1993) relatam que em células musculares maduras a proteína de filamentos intermediários desmina pode apresentar dois padrões de distribuição. Entretanto, cardiomiócitos maduros contêm desmina espalhada pelo citoplasma ou em co-localização com a linha Z das miofibrilas. Em cardiomiócitos imaturos, a desmina está acumulada em torno do núcleo e no citoplasma. A observação de cardiomiócitos em cultura sem o padrão de estriação característico sugere que a desmina deve ser a última proteína a ser integrada nas miofibrilas.

A infecção de cardiomiócitos pelas duas populações de *T. cruzi* estudadas promoveu desagregação do sincício e elevado número de células mortas.

Zhang *et al.* (1999) demonstraram que, na cardiomiopatia chagásica, os cardiomiócitos podem morrer por necrose e apoptose. Souza *et al.* (2003) estudando três populações de *T. cruzi* – cepa Y e os clones CL-Brener e Dm28c – demonstraram que cardiomiócitos infectados sofrem apoptose, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A intensidade do processo apoptótico está relacionada com a população estudada, ocorrendo mais cedo e com maior freqüência na infecção com Dm28c. *In vivo*, entretanto, esse clone induz miocardites mais leves.

Vários autores já relataram alterações estruturais do citoesqueleto de células musculares cardíacas após infecção com *T. cruzi*. Pereira *et al.* (1993) ressaltam a ruptura dos microfilamentos de actina e filamentos intermediários,

além de desorganização de microtúbulos. Paulin *et al.* (1988) relatam que o número e a distribuição de microtúbulos alteram-se conforme o tempo de infecção, perdendo o padrão radial de distribuição. Rodríguez *et al.* (1995) entretanto, relatam a reorganização dos microfilamentos de actina, relacionada com o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , e que a permanência dos tripomastigotas no interior da célula é dependente desse rearranjo dos microfilamentos de actina.

Pereira *et al.* (1993) ressaltam a permanência da ruptura das miofibrilas e do citoesqueleto nas regiões ocupadas pelas amastigotas. Quando o citoplasma celular está repleto de amastigotas, os filamentos de actina concentram-se na periferia da célula tornando-a arredondada (Carvalho *et al.* 1999).

Em nosso trabalho, a infecção com a cepa Y induziu maior desagregação do sincício e maior parasitismo de cardiomiócitos (média de 30 amastigotas/célula) quando comparado com clone CL-Brener (média de 20 amastigotas/célula).

Ruiz *et al.* (1998) não observou diferenças entre a cepa Y e o clone CL-Brener, quanto à expressão de glicoproteínas de superfície. Ambas apresentam expressão elevada de glicoproteínas com alta capacidade indutora de cálcio, como gp82, e baixos níveis de glicoproteínas com pequena capacidade sinalizadora de cálcio, como gp 35/50.

Estudos anteriores do nosso laboratório (Camargos *et al.*, 2000) mostraram que a infecção de ratos jovens com o clone CL-Brener resulta em maior parasitemia e maior taxa de mortalidade que a cepa Y; a intensidade da miocardite é similar nos dois grupos.

Em nosso trabalho, detectamos a produção de NO por cardiomiócitos infectados com a cepa Y e com o clone CL-Brener, na ausência de estímulo prévio por citocinas. A infecção com o clone CL-Brener, entretanto, induziu maior produção de NO e durante mais tempo, dois dias, sendo a produção do segundo dia maior que a do primeiro.

O NO sintetizado a partir do NOS2 possui atividade citotóxica, antiviral e antimicrobiana (Pinsky *et al.* 1999). Vespa *et al.* (1994) demonstraram,

utilizando moléculas doadoras de NO, que este é capaz de matar tripomastigotas e, que essa atividade tripanocida é tempo e dose dependente.

Machado *et al* (2000) também observaram produção de NO em cardiomiócitos de murinos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, na ausência de estímulo por citocinas.

Além de seu efeito tripanocida, sabe-se que o NO possui atividade citotóxica. De acordo com Pinsky *et al.* (1999) o NO produzido pela INOS pode induzir a inibição da síntese de DNA e apoptose. Além disso, demonstrou que NO sintetizado por cardiomiócitos era capaz de induzir apoptose nos cardiomiócitos vizinhos e que esse processo era inibido por inibidores de NOS. Machado *et al.* (2000) demonstraram que cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* expressam mRNA para NOS2 e produzem NO. Esses dados corroboram os nossos resultados, pois além de detectarmos a produção de NO obtivemos um grande número de células mortas por apoptose em consequência da infecção. O clone CL-Brener induziu a maior produção de NO, e por mais tempo. Os cardiomiócitos infectados com esse isolado possuíam um menor número de amastigotas no citoplasma. Baseado nesses dados e na literatura, podemos sugerir que esse isolado é mais eficiente na indução da produção de NO e, conseqüentemente, sofrem a ação desse tripanocida. Portanto, o cardiomiócito parece ser mais capaz de controlar a infecção com o clone CL-Brener que com a cepa Y.

A produção de NO, via NOS2, é induzida por citocinas, como, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-6. Cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* expressam mRNA para TNF- α e IL-1 β (Machado *et al.*, 2000).

Nossos resultados demonstraram que ambas as populações foram capazes de induzir a produção de TNF- α no primeiro dia de infecção, e os níveis de TNF- α induzidos pela cepa Y foram aproximadamente 3 vezes maiores que os induzidos pelo clone CL-Brener.

Lima *et al.* (1997) demonstraram que TNF- α é necessário para o processo inflamatório e para controle do parasitismo em camundongos infectados com *T. cruzi*. Chandrasekar *et al.* (1998) demonstraram a presença de TNF- α , IL-1 β e NOS2 no coração após 36 horas de infecção com cepa

Sylvio X10/7 de *T. cruzi*, e esse aumento era sustentado até o 15º dia de infecção.

Fichera *et al.* (2004) demonstraram que cardiomiócitos em cultura infectados com a cepa Silvio X10/4 e estimulados com TNF- α produzem NO.

Na ausência da infecção, TNF- α não é capaz de induzir a produção de NO. TNF- α atua através da sua interação com receptor (TNFR) e essa ligação é capaz de induzir diferentes cascatas de transdução de sinal, como a do NF- κ B (Ashkenazi & Dixit, 1998). Cardiomiócitos de camundongos expressam TNFR1 (Song *et al.* 2000). Meldrum (1998) demonstra que TNF- α inibe a contração do miocárdio e induz apoptose de cardiomiócitos murinos através da estimulação de TNFR1. A indução de apoptose ocorre em paralelo ao aumento do mRNA para NOS2 e produção de NO. Baseado nesses dados, Meldrum (1998) conclui que TNF- α induz apoptose através da expressão de NOS2 e da produção de NO. (Meldrum, 1998). Nakamura *et al.* (1998) também relatam que, em cardiomiócitos, TNF- α pode induzir hipertrofia ou apoptose.

Em nosso trabalho demosntramos que a infecção com a cepa Y resultou na produção de elevados níveis de TNF- α e em grande número de cardiomiócitos mortos por apoptose, o que nos leva a considerar que essa citocina, juntamente com NO, pode ser responsável pela proeminente redução celular encontrada.

Nosso trabalho também demonstrou que ambos os isolados foram capazes de induzir a produção de IL-1 β no primeiro dia de infecção, e que a cepa Y demonstrou uma tendência em induzir maiores níveis. Fichera *et al* (2004) demonstrou que cardiomiócitos não infectados e estimulados com IL-1 β produziam NO. Além disso, comparando os níveis de NO produzidos por cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* e estimulados com IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , constatou que IL-1 β era a que induzia os maiores níveis de NO. Devido a grande capacidade de induzir a produção de NO, IL-1 β pode contribuir para aumento da apoptose de cardiomiócitos infectados encontrado nesse trabalho. Petersen & Burleigh (2003), estudando cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi*, demonstraram que essas células desenvolviam hipertrofia mediada

por IL-1 β , e esta citocina atua concomitantemente com TNF- α induzindo a translocação do fator de transcrição κ B para o núcleo.

Nossos resultados mostraram que cardiomiócitos não infectados, com 3 e 6 dias de cultura, e infectados com ambos os isolados, produzem NGF. O clone CL-Brener induziu a produção de NGF nos primeiros dois dias de infecção, mas em níveis inferiores aos induzidos pela cepa Y no primeiro dia de infecção. Furukawa *et al.* (1984) demonstraram que cardiomiócitos murinos em cultura sintetizam e secretam um fator que é imunologicamente e biologicamente indistinguível do NGF da glândula submaxilar de camundongos.

Vários autores têm relatado diferentes funções fisiológicas para NGF. No sistema nervoso periférico, o NGF promove o desenvolvimento, a sobrevivência e a diferenciação de neurônios simpáticos e sensitivos derivados da crista neural. Brodie & Sampson (1990) relataram que NGF promovia a diferenciação de células musculares esqueléticas em cultura. Rende *et al.* (2000) relataram que NGF influenciava a diferenciação de mioblastos, fusão de mioblastos para formar miotubos, proliferação e morfologia celular de mioblastos e que essas funções eram mediadas por TrkA. Wheeler & Bothwell (1992) relataram que NGF e seu receptor de baixa afinidade p75 parecem atuar na regulação da morfogênese e miogênese em ratos.

Inúmeros trabalhos têm ressaltado a atuação do NGF na regulação da resposta imune e inflamatória (Gee *et al.* 1983; Bischoff & Dahinden 1992; Aloe *et al.* 1997; Bennett *et al.* 1998). Kannan *et al.* (1991) relataram aumento da fagocitose e produção de superóxido em neutrófilos murinos sob estímulo de NGF. NGF induz proliferação de linfócitos e promove a diferenciação de linfócitos B para secreção de imunoglobulinas como, IgM, IgA e IgG (Otten *et al.* 1989). Susaki *et al.* (1996) demonstraram que NGF promove fagocitose, atividade antimicrobiana e produção de IL-1 β por macrófagos peritoniais murinos. Recentemente, Kuno *et al.* (2006) demonstraram em astrócitos, que TNF- α induz produção de NGF através de seus receptores (TNFRs). Hattori *et al.* (1996) demonstraram que induzia a produção de NGF em fibroblastos via TNFR1. Sabe-se que cardiomiócitos possuem TNFR1 e nossos resultados demonstram que secretam TNF- α . Kuno *et al.* (2005) demonstraram que TNF- α

atua de maneira autócrina regulando a secreção de mediadores inflamatórios, como o próprio TNF- α . Sendo assim, podemos sugerir que o TNF- α produzido pelos cardiomiócitos infectados esteja induzindo a produção de NGF, e este atuaria aumentando a ativação do sistema imune em resposta à infecção parasitária.

Nossos resultados parecem confirmar essa hipótese, a cepa que induz a maior produção de NGF é a que produz maiores níveis de TNF- α , a cepa Y. Heese *et al.* (2006) demonstraram que ativação do fator de transcrição κB é evento chave para produção de NGF em linfócitos B. Citocinas, como TNF- α e IL-1 β , assim como o próprio *T. cruzi* são capazes de ativar, induzindo a produção de NGF, o que explicaria o aumento na produção de NGF em cardiomiócitos infectados. Além de atuar diretamente induzindo a produção de NGF, o *T. cruzi*, através de sua molécula trans-sialidase, se liga ao receptor TrkA promovendo sua internalização e ativação (Woronowicz *et al.* 2004).

Estudos anteriores do nosso laboratório (Martinelli *et al.* 2006) demonstraram presença de mRNA para NGF e da proteína NGF em cardiomiócitos de ratos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Esse estudo revelou aumento nos níveis cardíacos de NGF aos 20 dias de infecção, concomitantemente ao processo de desnervação simpática do miocárdio. Os níveis cardíacos de NGF diminuem consideravelmente na fase crônica da infecção, quando a densidade de terminações noradrenérgicas cardíacas já se encontra em padrão similar a de animais controles. Nessa fase da infecção, há resolução do processo inflamatório, de modo que não se pode, ainda, inferir a real contribuição de cardiomiócitos e de células inflamatórias, para a elevação dos níveis cardíacos desse fator, na fase aguda da infecção.

Nosso estudo, *in vitro*, indica que a infecção com *T. cruzi*, *per se*, aumenta a secreção de NGF por cardiomiócitos. Assim, podemos sugerir que esse fator neurotrófico pode ter papel não apenas na regeneração de fibras nervosas, mas também na construção de resposta imunitária local ou sistêmica.

Os resultados e metodologias desenvolvidos nesse trabalho nos permitirão desenvolver outros projetos abordando a relação cardiomiócito-

T.cruzi. Para estudarmos melhor o papel de citocinas, NO e do NGF como ativador da resposta imune na infecção com *T.cruzi*, será interessante realizarmos uma co-cultura de cardiomiócitos e macrófagos. Poderemos estudar a ativação de macrófagos pelos mediadores químicos secretados pelos cardiomiócitos infectados e seu papel na eliminação do parasita.

Baseando-se nos nossos resultados e resultados prévios do laboratório de Neurobiologia sobre o comprometimento do sistema nervoso na doença de Chagas humana e experimental., pretendemos estudar, *in vitro*, a ação do *T. cruzi* sobre a interação de neurônios com sua célula-alvo. Para isso, utilizaremos co-cultivo de neurônios autonômicos simpáticos e cardiomiócitos. Essa abordagem não foi realizada anteriormente no estudo da doença de Chagas e permitirá esclarecer não só o comportamento diferencial de populações distintas de *T.cruzi* no estabelecimento de lesões, como a participação de cardiomiócitos nos processos degenerativos e regenerativos. Neste projeto pretendemos verificar, *in vitro*, se a infecção de cardiomiócitos com diferentes populações de *T. cruzi* interfere, de modo distinto, com a interação dessas células com neurônios autonômicos simpáticos, principalmente em relação à produção de fatores neurotróficos e de citocinas e aspectos estruturais e funcionais da junção neuromuscular.

6.CONCLUSÕES

6. Conclusões

Consideramos importante ressaltar dois grupos de resultados. O primeiro refere-se ao desenvolvimento de protocolo para a manutenção de cardiomiócitos viáveis, em cultura, pelo período de 14 dias. Esse protocolo possibilitará explorar vários aspectos da biologia deste tipo celular, além de sua interação com *Trypanosoma cruzi*. O segundo grupo de resultados refere-se à infecção com *Trypanosoma cruzi*, especificamente da cepa Y e do clone CL-Brener.

A cepa Y apresentou maior capacidade infectante, pois as células que sobreviveram à infecção apresentavam maior número de amastigotas intracelulares (em média 30). Os cardiomiócitos que resistiram à infecção com clone CL-Brener apresentavam, em média, 20 parasitas por célula. Com relação à produção de óxido nítrico (NO), ambas as populações de *T. cruzi* foram capazes de induzir a produção de NO, na ausência de estímulo prévio por citocinas. A cepa Y induziu a produção de NO somente no primeiro dia de infecção e o clone CL-Brener induziu a produção de NO nos dois primeiros dias de infecção, sendo os níveis do 2º dia superiores ao 1º. Os níveis de NO induzidos pelo clone CL-Brener foram significativamente maiores que os induzidos pela cepa Y.

Em culturas de cardiomiócitos não infectadas, os níveis de TNF- α e IL-1 β foram indetectáveis. Ambas as populações de *T. cruzi* foram capazes de induzir a produção de TNF- α no primeiro dia de infecção e na ausência de estímulo prévio por outras citocinas. Os níveis de TNF- α induzidos pela cepa Y foram significativamente maiores que os induzidos pelo clone CL-Brener. Tanto a cepa Y quanto o clone CL-Brener foram capazes de induzir a produção de IL-1 β , na ausência de estímulo prévio por outras citocinas. Os níveis de IL-1 β mostraram uma tendência a valores mais elevados na infecção com a cepa Y, no primeiro dia de infecção.

- Em culturas de cardiomiócitos não infectadas ocorre produção de NGF a partir do 3º dia de cultura. A cepa Y induziu a produção de NGF somente no primeiro dia de infecção e o clone CL-Brener induziu a produção de NGF nos

dois primeiros dias de infecção, sendo os níveis do 1º dia superiores ao 2º. No 1º dia de infecção, os níveis de NGF induzidos pela cepa Y foram significativamente maiores que os induzidos pelo clone CL-Brener.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas:

Alberton B., Meyer D., Simpson D. Assembly and remodeling of myofibrils and intercalated discs in cultured neonatal rat heart cells. *J. Cell Sci.* 1986; 86: 233-248.

Aloe L., Bracci-Laudiero L., Manni L. The expanding role of nerve growth factor: from neurotropic activity to immunologic diseases. *Allergy.* 1997; 52: 883-894.

Andrade, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano (contribuição para o estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Revista Pat. Trop.*, v.3:65-121, 1974.

Andrade, S.G.; Andrade, V.; Rocha Filho, F.D.; Barral Netto, M. Análise antigênica de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.23: 245-250, 1981.

Andrade, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener, Z.; Andrade Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds.), *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan R.J., 177-200, 2000.

Andrews N.W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends Cell Biol.* 1995; 5: 133-137.

Araujo-Jorge, T.C.; Barbosa, H.S.; Meireles, M.N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 87 Suppl 5:43-56, 1992.

Ashkenazi A. & Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281: 1305-1208.

Bennett G.S., Garrett N.E., Diemel L.T., Brain S.D., Tomlinson D.R. Neurogenic cutaneous vasodilatation and plasma extravasation in diabetic rats: effects of insulin and nerve growth factor. *BR J Pharmacol*. 1998; 124(7): 1573-1579.

Bischoff S.C., Dahinden C.A. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood*. 1992; 79: 2662.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol*. 1973; 27: 347-382

Brener, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem Inst Osw Cruz*, v.82, p.205-213, 1987.

Brodie C., Sampson S.R. Nerve growth factor and fibroblast growth factor influences post-fusion expression of Na-channels in cultured rat skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 1990; 144: 492-497.

Burleigh B. & Andrews N.W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca⁺²-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem*. 1995; 270: 5172-5180.

Burleigh, B.A.; Woolsey, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cel. Microbiol*. 4(11):701-711, 2002.

Caler E.V., Chakrabarti S., Fowler K.T., Rao S., Andrews N.W. The exocytosis-regulatory protein sinaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med. 2001; 193: 1097-1104.

Calvet, C.M.; Meuser, M.; Almeida, D.; Meirelles, M.N.L.; Pereira, M.C.S. *Trypanosoma cruzi* - cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression *in vitro* and *in vivo*. Exp. Parasitol.; 107: 20-30, 2004.

Camargos E.R.S. & Machado C.R.S. Morphometric and histological analysis of the superior cervical ganglion in experimental Chagas'disease in rats. Am J Trop Med Hyg. 1988; 39: 456-462.

Camargos E.R., Haertel L.R.M., Machado C.R.S. Preganglionic fibers of the adrenal medulla and cervical sympathetic ganglia: differential involvement during experimental American trypanosomiasis in rats. J Exp Pathol. 1996; 77: 115-124.

Camargos E.R.S., Franco D.J., Garcia C.M.M.G., Dutra A.P., Teixeira A.L J.R., Chiari E., Machado C.R.S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. Am J Trop Med Hyg. 2000; 62(5): 604-612.

Camargos E.R., Machado C.R., Teixeira A.L., Rocha L.L., Ferreira A.J., Almeida A.P., Barton M., Teixeira M.M. Role of endothelin during experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats. Clin Sci (Lond). 2002; 103(48): 64-67S.

Campos M.A., Almeida I.C., Takeuchi O., *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol. 2001; 167: 416-423.

Campos M.A. & Gazzinelli R.T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Med Inflamm.* 2004; 13(3): 139-143.

Carvalho T.M. & de Souza W. Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct.* 1989; 45(6): 498-502

Carvalho T.M.U., Ferreira A.G., Coimbra E.S., Rosestolato C.T.F., de Souza W. Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1999; 31(3): 325-333.

Chandrasekar B., Melby P.C., Troyer D.A., Colston J.T., Freeman G.L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998; 152: 925-934.

Chandrasekar B., Melby P.C., Troyer D.A., Freeman G.L. Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Clin Exp Immunol.* 2000; 121: 112-119.

Chlopcikova S.; Psotova J.; Miketova P. Neonatal rat cardiomyocytes – a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. *Bio Med Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2001; 145 (2): 49-55

Chuenkova M. V., Furnari F.B., Cavenee W.K., Pereira M.A. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 9936-9941.

Chun L.L & Patterson P.H. Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons in vitro. I. Survival, growth, and differentiation of catecholamine production. J Cell Biol. 1977a; 75(3): 694-704.

Chun L.L & Patterson P.H. Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons in vitro. II. Developmental studies. J Cell Biol. 1977b; 75(3): 705-711.

Chun L.L & Patterson P.H. Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons in vitro. III. Effect on acetylcholine production. J Cell Biol. 1977c; 75(3): 712-718.

Clark W.A., Decker M.L., Barclat-Behnke M., Janes D.M., Decker R.S. Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long term primary culture. J Mol Cell Cardiol. 1998; 30: 139-155

Clubb F.J. & Bishop S.P. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat: an index for growth hypertrophy. Lab Investig. 1984; 50: 571-577.

Collart, M.A.; Baeuerle, P.A.; Vassalli, P. Regulation of TNF- α transcription in macrophages: involvement of four κ B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF- κ B. Mol. Cell. Biol., 10:1498-1506, 1990.

COPE (Cytokines online pathfinder encyclopaedia). Philippine University library. 1999, versão 4.0

Dias J.C.P. The treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis). *Ann Intern Med.* 2006a; 144(10): 772-774.

Dias J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad. Saúde Pública, R.J.* 2006b; 22(10): 2020-2021.

Downward, P. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev. Biol.* 2004; 15: 177-182.

Fichera L.E., Albareda M.C., Laucella S.A., Postan M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun.* 2004; 72:359-363.

Furukawa Y., Furukawa S., Satoyoshi E. Nerve growth factor secreted by mouse heart cells in culture. *J Biol Chem.* 1984; 259(2): 1259-1264.

Gazzinelli R.T., Ropert C., Campos M.A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol Rev.* 2001; 201: 9-25.

Gee A.P., Boyle M.D.P., Munger L., Lawman M.J.P., Young M. Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80: 7215.

Goldfeld, A.E.; Doyle, C.; Maniatis, T. Human TNF- α gene regulated by virus and LPS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 87:9769-9773, 1990.

Goldman B.I. & Wurzel J. Effect of subcultivation and culture medium on differentiation of human fetal cardiac myocytes. *In Vitro Cell Dev.* 1992; 28A: 109-119.

Green L.C.; Tannenbaum S.R.; Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science.* 1981; 212 (4490): 56-58.

Guerra L.B., Andrade L.O., Galvão L.M.C., Macedo A.M., Machado C.R.S. Cyclophosphamide-induced immunosuppression protects cardiac noradrenergic nerve terminals from damage by *Trypanosoma cruzi* infection in adult rats. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95: 505-509.

Halegoua S., Armstrong R.C., Kremer N.E. Dissecting the mode of action of neuronal growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991; 165: 119-170.

Hall B.F., Webster P., Ma A.K., Joiner K.A., Andrews N.W. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J Exp Med.* 1992; 176: 313-325.

Hattori A., Hayashi K., Kohno M. Tumor necrosis factor (TNF) stimulates the production of nerve growth factor in fibroblast via the 55-kDa type 1 TNF receptor. *FEBS Lett.* 1996; 379: 157-160.

Hiltunen J.O., Arumae U., Moshnyakov M., Saarna M. Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in developing rat heart. *Circ Res.* 1996; 79(5): 930-939.

Huang, H., et al.,. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 31:75-88, 1999.

Kannan Y., Eshio H., Koyama H., Okada M., Oikawa M., Yoshihara T., Kaneko M., Matsuda H. 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood*. 1991; 77: 1320.

Kirchhoff, L.V. American trypanosomiasis (Chagas`disease). *Gastroenterol. Clin. North Am.* 25: 517-533; 1996.

Kopp, E.B. and Ghosh, S. NF- κ B and Rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.*, 58:1-27, 1995.

Kuno R., Wang J., Kawanokuchi J., Takeuchi H., Mizuno T., Suzumura A. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α . *J Neuroimmun.* 2005; 162: 89-96.

Kuno R., Yoshida Y., Nitta A., Nabeshima T., Wang J., Sonobe Y., Kawanokuchi J., Takeuchi H., Mizuno T., Suzumura A. The role of TNF- α and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res.* 2006; 1116: 12-18

The Lancet editorial. Chagas`disease – an epidemic that can no longer be ignored. 2006; 368.

Laurent, J.P.; Barnabe, C.; Quesney, V.; Noel, S.; Tibayrenc, M. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 114:213-218, 1997.

Ley V., Robbins E.S., Nussenzweig V., Andrews N.W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med.* 1990; 171: 401-413.

Li R-K., Mickle D.A.G, Weisel R.D., Zhang J., Mohabeer M.K. In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1996a; 78: 283-288.

Li R-K., Mickle D.A.G, Weisel R.D., Carson S., Omar S.S., Tumiati L.C., Wilson G.J., Williams W.G. Human pediatric and adult ventricular cardiomyocytes in culture: assessment of phenotypic changes with passaging. *Cardiovasc Res.* 1996b; 32: 362-373.

Lima E,C, Garcia I., Vicentelli M.H., Vassali P., Minoprio P. Evidence for a protective role of Tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 1997; 65: 457-465.

Lockhart S.T., Mead J.N., Pisano J.M., Slonimsky J.D., Birren S.J. Nerve growth factor collaborates with myocyte-derived factors to promote development of presynaptic sites in cultured sympathetic neurons. *J Neurobiol.* 2000; 42(4): 460-476.

Lopez M., Huynh C., Andrade L.O., Pypaert M., Andrews N.W. Role of sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 119: 141-145.

Lumsden, W.H.R. Biological aspects of trypanosomiasis research, 1965 a retrospect 1969. *Ad. Parasitol.*, 8:228-249, 1970. In. Andrade, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano (contribuição para o estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Ver Revista Pat. Trop.*, v.3:65-121, 1974.

Machado A.B., Machado C.R., Gomes C.B. Depletion of heart norepinephrine in experimental acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* 1975; 31(10): 1202-1203.

Machado A.B.M., Machado C.R.S., Gomes C.B. *Trypanosoma cruzi*: acetylcholine content and cholinergic innervation of the heart in rats. *Exp Parasitol.* 1979; 47: 107-115.

Machado C.R.S., Machado A.B.M., Chiari C.A. Recovery from heart norepinephrine depletion in experimental Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27(1): 20-24.

Machado C.R.S., Gomez M.V., Machado A.B. Changes in choline acetyltransferase activity of rat tissues during Chagas` disease. *Braz J Med Biol Res.* 1987; 20: 697-702.

Machado C.R.S. & Ribeiro A.L.P. Experimental American trypanosomiasis in rats: sympathetic denervation, parasitism and inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989; 84(4): 549-556.

Machado C.R.S.; Oliveira D.A.; Magalhães M.J.; Carvalho, E.M.R.D.; Ramalho-pinto F.J. *Trypanosoma cruzi* infection in rats induced early lesion of the heart noradrenergic terminals by a complement-independent mechanism. *J Neural Transm.* 1994, 97: 149-157

Machado F.S.; Martins, G.A.; Aliberti, J.C.S.; Mestriner, F.L.A.C.; Cunha, F.Q.; Silva, J.S. *Trypanosoma cruzi* - infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent NO-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, 102:01-06, 2000.

Martinelli P.M., Camargos E.R., Azevedo A.A., Chiari E., Morel G., Machado C.R. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Auton Neurosci.* 2006; 17(article in press).

Meirelles, M.N.L.; Pereira, M.C.S.; Singer, R.H.; Soeiro, M.N.C.; Garzoni, L.R.; Silva, D.T.; Barbosa, H.S.; Araujo-Jorge, T.C.; Masuda, M.O.; Capella, M.A.M.; Lopes, A.G.; Vermelho, A.B. *Trypanosoma cruzi* - cardiomyocyte: new contributions regarding a better understanding of this interaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 94, Suppl.1:149-152, 1999.

Meldrum D.R. Tumor necrosis factor in the heart. Am J Physiol. 1998; 274: R577-R595.

Mello R.C.N. & Machado C.R.S. Depletion of radiosensitive leukocytes exacerbates the heart sympathetic denervation and parasitism in experimental Chaga's disease in rats. J Neuroimmunol. 1998; 84: 151-157.

Ming M., Ewen ME., Pereira M.E.A. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. Cell. 1995; 82:287-296.

Morel, C.; Chiari, E.; Camargo, E.P.; Mattei, D.M.; Romanha, A.J.; Simpson, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patten of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci., 77(11):6810-6814, 1980.

Muzio M., Polentarutti N., Bosisio D., Manoj Kunar P.P., Mantovani A. Toll like receptor family and sigmaling pathway. Biochem Soc Trans. 2000; 28: 563-566.

Nagib P.R.A. Infecção de ratos jovens e adultos com distintas populações de *Trypanosoma cruzi*: histopatologia, frequência de leucócitos do sangue periférico e produção de citocinas. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2005. 96p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Celular).

Nakamura K., Fushimi K., Kouchi H., Mihara K., Miyazaki M., Ohe T., Namba M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophic induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation*. 1998; 98: 794-799.

Neira, I.; Ferreira, A.T.; Yoshida, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int. J. Parasitol.*, 32:405-414, 2002.

Oliveira, K.R. Distinção *in vitro* de diferentes populações de *Trypanosoma cruzi*: Proliferação em células Vero CCL-81 e ativação de macrófagos peritoneais de ratos. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2003. 92p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Celular).

Orike N., Thrasivoulou C., Wrigley A., Cowen T. Differential regulation of survival and growth factor in adult sympathetic neurons: an in vitro study of neurotrophin responsiveness. *J Neurobiol*. 2001; 47(4): 295-305.

Otten U., Ehrhard P., Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B-lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 10059-10063.

Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(25): 13766-13771.

Paiva C.N., Souto-Pradrón T., Costa D.A., Gattass C.R. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitol*. 1998; 117: 483-490.

Paulin J.J., Keith C.H., Tarlenton R.L. A monoclonal antibody to alpha tubulin recognizes host cell and *Trypanosoma cruzi* tubulins. *J Protozool*. 1988; 35: 123-129.

Paves H. & Saarma M. Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res*. 1997; 290(2): 285-297.

Pereira M.C.S., Costa M., Chagas Filho C., Meirelles M.N.L. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1993; 25(4): 559-569.

Petersen C.A. & Burleigh B.A. Role of interleukin-1 β in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun*. 2003; 71: 4441-4447.

Pinsky D.J., Walif A.J.I., Szabolcs M., Athan E.S., Liu Y., Yang Y.M., Kline R.P., Olson K.E., Cannon P.J. Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture. *Am J Physiol*. 1999; 277: H1189-H1199.

Plumas-Marty, B.; Verwaerde, C.; Loyens, M.; Velge, P.; Taibi, A.; Cesbron, M.F.; Capron, A.; Ouassi, M.A. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas` Disease. *Parasitology*, 104 Pt 1:87-98, 1992.

Prata, A. Chagas` Disease. *Infect. Dis. Clin. North America*, 8:61-75, 1994.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas` disease. *The Lancet*, 1:92-100, 2001.

Procopio D.O., Barros H.C., Mortara R.A. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Cell Biol.* 1999; 78: 911-924.

Rende M., Brizi E., Conner J., Treves S., Censier K., Provenzano C., Tagliatela G., Sanna P.P., Donato R. Nerve growth factor (NGF) influences differentiation and proliferation of myogenic cells in vitro via TrkA. *Int J Devl Neurosc.* 2000; 18: 869-885.

Rodríguez A., Rioult M.G., Ora A., Andrews N. A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca⁺² mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol.* 1995; 129: 1263-1273.

Rodríguez, A.; Samoff, E.; Rioult, M.G.; Chung, A.; Andrews, N.W. Host cell invasion by Trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J.Cell.Biol.*, 134(2):349-362, 1996.

Ruiz, R.C.; Favoreto Junior; Dorta, M.L.; Oshiro, M.E.M.; Ferreira, A.T.; Manque, P.M.; Yoshida, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca⁺² signalling activity. *Biochem. J.*, 330:505-511, 1998.

Rush R.A., Chie E., Liu D., Tafreshi A., Zettler C., Zhou X.F. Neurotrophic factors are required by mature sympathetic neurons for survival, transmission and connectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24(8): 549-555.

Schenkman S., Dias C., Nussenzweig V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptor at restricted cell surface domains. *Exp Parasitolog.* 1991; 72: 76-86.

Schenkman S. & Mortara R.A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes.. *J Cell Sci.* 1992; 101: 895-905.

Scianni, A.A. Efeitos do antagonista do receptor do fator de ativação de plaqueta na infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em ratos. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2001. 74p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Celular).

Shindo T., Ikeda U., Ohkawa F., Kawahara Y., Yokoyama M., Shimada K. Nitric oxide synthesis in cardiac myocytes and fibroblasts by inflammatory cytokines. *Cardiovasc Res.* 1995; 29: 813-819.

Sibley, L.D. & Andrews, N.W. Cell invasion by un-palatable parasites. *Traffic*, 1:100-106, 2000.

Silva, G.C. Avaliação da infecção por diferentes inóculos da cepa JG de *Trypanosoma cruzi* em ratos. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 1999. 128p. (Dissertação, Mestrado em Biologia Celular).

Song W., Xiangru L., Feng Q. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 595-602

Souza, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In : Koogan, Guanabara. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro: 2000. Cap. 7, p. 88-126.

Souza E.M., Araújo-Jorge T.C., Bailly C., Lansiaux A., Batista M.M., Oliveira G.M., Soeiro M.N.C. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res.* 2003; 314: 223-235.

Susaki Y., Shimizu S., Katakura K., Watamabe N., Kawamoto K., Matsumoto M., Tsudzuki M., Furusaka T., Kitamura Y., Matsuda H. Functional properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor. *Blood.* 1996; 88(12): 4630-4637.

Tanowitz, H.B.; Kirchhoff, L.V.; Simon, D.; Morris, S.A.; Weiss, L.M.; Wittner, M. Chagas` disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:400-419; 1992.

Tardieux, I.; Webster, P.; ravesloot, J.; Boron, W.; Lunn, J.A.; Heuser, J.E.; Andrews, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, 71(7):1117-1130, 1992.

Teixeira, A.R.L. The Stercorarian trypanosomes. In : Soulsby, E. J. L. Immune response in parasitic infections: immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1987. p. 25-118.

Tibayrenc, M. Populations genetics of parasitic protozoa and others microorganisms. Adv. Parasitol. 36:47-115, 1995.

Titus R.G., Sherry B., Cerami A: The involvement of TNF, IL-1, and IL-6 in the immune responseto protozoan parasites. Immunol Today. 1991; 12: A13-A16.

Tsujino M., Hirata Y., Imai T., Kanno K., Eguchi S., Ito H., Marumo F. Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin-1 β in cultured rat cardiocytes. Circulat. 1994; 90: 375-383.

Vago, A.P.; Macedo, A.M.; Oliveira, R.P.; Andrade, L.C.; Chiari, E.; Galvão, L.M.C.; Reis, D.D.; Pereira, M.S.; Simpson, A.J.G; Tostes, S.; Pena, S.D.J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. Am. J. Pathol., 149:2153-2159, 1996.

Vespa, G.N.R.; Cunha, F.Q.; Silva, J.S. Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasit *in vitro*. Infec. Immunol., 62:5177-5182, 1994.

Villalta, F.; Zhang, Y.; Bibb, K.E.; Prata, S.; Burns, J.M.; Lima, M.F. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligant of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligant up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. Mol. Cell. Biol. Res. Commun., 2(1):64-70, 1999.

Wakade A.R & Bhave S.V. Facilitation of noradrenergic character of sympathetic neurons by co-culturing with heart cells. *Brain Res.* 1988; 458(1): 115-122.

Wheeler E.F & Bothwell M. Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *J Neurosci.* 1992; 12(3): 930-945.

Wheeler E. F.; Gong H.; Grimes R.; Benoit D.; Vazquez L. p75 NTR and Trk receptors are expressed in reciprocal patterns in a wide variety of non-neuronal tissues during rat embryonic development, indicating independent receptor functions. *J Comp Neurol.* 1998; 391(4): 407-428

Wilkowsky S.E., Barbieri M.A., Stahl P., Isola E.L.D. *Trypanosoma cruzi* phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res.* 2001; 264: 211-218.

Wyllie D.H., Kiss-Toth E., Visintin A., Smith S.C., Boussouf S., Segal D.M., Duff G.W., Dower S.K. Evidence for an accessory protein function for Toll like receptor 1 in anti bacterial responses. *J Immunol.* 2000; 165: 7125-7132.

Xie, Q.W.; Kashiwabara, Y.; Nathan, C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 269:4701-4708, 1994.

Yoshida,N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78(1): 87-111.

Zhang, L. and Tarleton, R.L. Persistent production of inflammatory and antiinflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule

expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp. Parasitol.*, 84:203-213, 1996.

Zhang J., Andrade Z.A., Yu Z.X., Andrade S.G., Takeda K., Sadirgurksky M., Ferrans V.J. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31: 581-596.