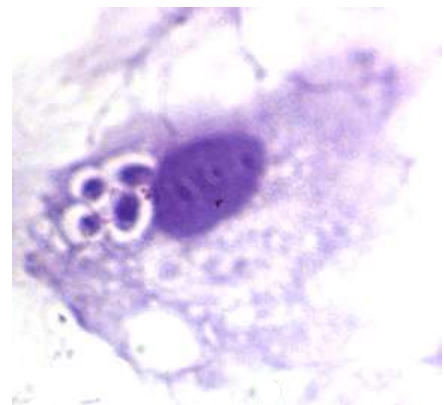


Fabio Henrique Guimarães Braga

**Efeitos da Endotelina 1 na infecção, *in vitro*,
de cardiomiócitos com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi***



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte
2011

Fabio Henrique Guimarães Braga

**Efeitos da Endotelina 1 na infecção, *in vitro*,
de cardiomiócitos com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi***

Trabalho de Dissertação
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Elizabeth Ribeiro da Silva
Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Patrícia Massara Martinelli

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte
2011

Essa dissertação foi realizada no Laboratório Prof^a Conceição Machado do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob a orientação das Professoras Elizabeth Ribeiro da Silva e Patrícia Massara Martinelli, com o apoio financeiro do CNPq e da FAPEMIG

Dedico essa dissertação as minhas orientadoras Prof^{as}
Elizabeth Ribeiro da Silva e Prof^{as} Patrícia Massara Martinelli.
Muito obrigado por esses dois anos de dedicação, trabalho e
carinho com o qual me receberam e me construíram como
profissional, como pesquisador e pessoa. Serei muito grato
eternamente.

Às vezes bate uma idéia de desistir
então a gente para, põe o sonho de lado
e fica por ai pensando e sofrendo.

Mas não é por muito tempo não.
Qualquer coisa da estrada
passarinho, flor, montanha, nuvem,
o menino que nos acenou sorrindo.
Esperança à toa que seja
Vira roteiro de viagem.

Precisa ver os olhos brilhando com que
partimos
mochila nas costas, cantando o sol e a
sede
prazer e cansaço de quem caminha

sempre em frente
em direção de algo mais além de nós
mesmos
de nossos desejos, medos e frustrações.

Porque é para lá que estamos indo
é para lá que sabemos ir

Passos de uma caminhada que nenhum de
nós
sabe quando começou nem quando
terminará.

Geraldo Eustáquio de Souza

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a N^a S^a da Medalha Milagrosa por tudo de bom que proporcionam na minha vida, todos os ensinamentos e por todas as oportunidades;

Ào meu pai Iran, meu espelho, meu orgulho. Por todo seu esforço para que hoje eu pudesse estar aqui, realizando esse grande sonho;

À minha mãe Jacqueline meu alicerce, meu porto seguro e minha professora. Obrigado por me dar todo esse carinho e todo esse amor que são indispensáveis na minha vida.

À minha irmã Isabel, que sempre estava em casa me esperando com um abraço apertado e com muito carinho, e por me “agüentar” mesmo no auge do estresse dos últimos tempos.

A todos os meus familiares, indispensáveis na minha vida, muito obrigado por tudo. À minha avó Arlene, meus padrinhos, tios, primos, a minha prima Valdênia que foi fundamental na minha graduação, ao “agregado” Danilo e a todos que me ajudaram e contribuíram para que hoje eu estivesse aqui.

A meus amigos, meus grandes amigos. A família que eu escolhi, as pessoas que são essenciais na minha vida. Em especial ao Lucas, Saile, Guilherme, Saint Clair, Cyntia, Tássia, aos “Carruscas”, Matheus, Manel, Fabyano..... Muito obrigado por tudo!

E um agradecimento mais do que especial a pessoas que foram fundamentais durante esses dois anos de mestrado:

À Prof^a Elizabeth Ribeiro, pelo seu exemplo de paixão pela ciência, de profissionalismo, de responsabilidade e de ética. Por mostrar-nos, a todo momento, que CIÊNCIA não é brincadeira. Por estar ali por mim e por todos, sempre disposta a discutir e buscar meios pra realizarmos nossos “sonhos” científicos. Pelo carinho, pelo esforço, pelo exemplo e pela dedicação despendida a mim, principalmente nos últimos tempos. Pela orientação, ou melhor, por colocar dentro de mim uma semente chamada Ciência que nunca vai parar de crescer. Muito obrigado por tudo.

À Prof^a Patrícia Martinelli, meu exemplo de Profissional, Professor e Pesquisador, com “P” maiúsculo. Não tenho palavras pra agradecer por tudo que você fez por mim durante esse dois anos. Por ter me aceitado como seu aluno e ter enfrentado de peito aberto situações às vezes difíceis para que eu pudesse continuar ali trabalhando, blindado dos males externos. Por não ter desistido de mim e estado presente mesmo em momentos em que eu mesmo já tinha desistido. Por estar ali para me ensinar com toda paciência e com todo carinho, me construindo com pesquisador e também como professor. Por estar ali para me defender e me proteger de tudo e de todos. Por me mostrar que mesmo sendo um trabalho sério, a ciência pode ser feita de forma muito agradável. Por nunca se esquecer de mim e estar comigo sempre, mesmo em momentos pessoais difíceis. Enfim, por tudo de bom que você trouxe pra minha vida. Muito obrigado!

À Andrea Moraes, minha amiga, minha 3^a orientadora. Por todos os ensinamentos, por todas as conversas, pelos desabafos mútuos, pelas caronas que me salvaram muitas vezes, pela ajuda e por estar ali sempre presente. Muito obrigado por tudo.

Ao Matheus: meu aluno de IC, meu amigo, meu professor. Essa dissertação também dedico a você, porque não teria conseguido sem sua ajuda. Obrigado por estar por perto sempre quando precisava, por me distrair e me fazer rir quando não estava bem, por discutir e ajudar a entender meus resultados, às vezes muito loucos, e por estar ali sempre pronto “pro que der e vier”. Tenho muito orgulho de ter participado um pouquinho da sua formação e tenho certeza que muito em breve vou aplaudir de pé seu sucesso.

À Josiane, minha amiga e companheira de tantos anos. Que me ensinou a fazer a cultura de cardiomiócitos. Muito obrigado pela atenção e amizade.

À Lud, a aluna de IC que na verdade deveria ser aluna de doutorado, tamanha sua competência. Muito obrigado por tudo e não desista da Ciência porque ela precisa de você.

À Professora Luciana, pelas falas tão bem colocadas, por estar sempre disposta a ajudar quando a sala de cultura estava prestes a nos engolir e por nos ajudar nos experimentos in vitro.

A Professora Leonor Guerra, pelo exemplo de paciência e pela atenção.

Ao Prof^o José Carlos Nogueira, pelas conversas sempre muito agradáveis, pelos conselhos, pela atenção e pelo grande carinho. Sou muito feliz por ter convivido com você durante esse tempo.

Ao Prof^o Robson Rossoni, meu “pai” científico. Você me mostrou o caminho e me colocou no rumo certo. Tenho muito orgulho de um dia ter sido seu aluno e tenho muito prazer em dizer isso. Seu grande conhecimento, sua preocupação e responsabilidade na formação de seus alunos são exemplos que vou levar pra vida inteira. Um muito obrigado desse seu “filho” pesquisador.

À Prof^a Marilene Michalick, que sempre me incentivou a entrar no mundo da ciência.

À Barbara Hissa, colega e amiga de cultura. Muito obrigado pelas conversas e pelas discussões científicas.

A todos os amigos do laboratório, pela companhia e pela amizade. Em especial ao Lucas, Luciano, Jaqueline, Pedro e Lú Hoffert.

Ao pessoal do Centro de Microscopia da UFMG. Muito obrigado pelo aprendizado. Em especial a Roberta e ao Kinulpe.

Aos novos professores e novos colegas de laboratório. Espero que vocês tragam coisas muito boas a esse lugar tão importante pra mim. Em especial à Luana e a Patrícia: Sucesso pra vocês nessa nova etapa.

Aos colegas da Biologia Celular pelo aprendizado, especialmente a Natália Hojo e a Luisa Cenísio, duas grandes amigas.

Aos colegas do departamento pela amizade e aprendizado.

Ao técnico Carlos Henrique pelos ensinamentos e conversas

À Sibebe, ex secretária do programa de pós-graduação, pela amizade e pelas conversas e confissões sempre bem animadas.

À Diana, nova secretária do programa de pós-graduação, pela competência e disposição.

A todo o pessoal do Centro de Bioterismo da UFMG (Cebio) pela atenção e por me salvarem inúmeras vezes

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e aos seus professores pela oportunidade.

À UFMG, por se tornar meu universo e por me dar a oportunidade de crescer.

Às agências financiadoras que possibilitaram a realização desse projeto

E a todos que de alguma forma contribuíram nesse projeto

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Animais	17
3.2 Isolamento e cultivo de cardiomiócitos	17
3.3 Caracterização morfológica da cultura de cardiomiócitos	17
3.3.1 Imunofluorescência para alfa actinina	18
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	18
3.4 Avaliação da Viabilidade Celular	19
3.5 Delineamento experimental	19
3.6 Obtenção dos parasitos e infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
3.7 Tratamento com endotelina 1 e bosentan	21
3.8 Contagem dos parasitos intracelulares	22
3.9 Dosagem de Óxido Nítrico	22
3.10 Dosagem de Endotelina 1	22
3.11 Dosagem de NGF, INF γ , IL-10, IL-1 β e TNF- α	23
3.12 Análise Estatística	24

4 RESULTADOS	25
4.1 Morfologia e viabilidade de cardiomiócitos em cultura celular	26
4.2 Efeito do tratamento com bosentan e ET-1 sobre a produção de NGF, ET-1, NO e citocinas por cardiomiócitos controles	29
4.3 Efeito do tratamento com bosentan e ET-1 sobre a produção de NGF, ET-1, NO e citocinas por cardiomiócitos infectados pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	31
4.3.1 Produção de NGF	31
4.3.2 Produção de ET-1	32
4.3.3 Produção de Óxido Nítrico	32
4.3.4 Produção de citocinas	33
4.4 Efeito do tratamento com bosentan e ET-1 sobre a infecção de cardiomiócitos com cepa Y de <i>T. cruzi</i>	35
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	44
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	2
Figura 2. Representação esquemática do perfil de células inflamatórias no miocárdio durante as fases aguda e crônica da infecção com <i>T. cruzi</i> .	6
Figura 3. Representação esquemática das vias de formação e de ligação a receptores da endotelina.	11
Figura 4. Ensaio de viabilidade por MTT em cardiomiócitos.	21
Figura 5. Fotomicrografias de cardiomiócitos no sexto dia de cultivo (terceiro dia em meio DMEM-F12 sem soro fetal bovino).	27
Figura 6. Fotomicrografias de cardiomiócitos com 24(6A), 48(6B) e 72(6C) horas de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> .	28
Figura 7. Níveis de NGF (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos controles, não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina.	29
Figura 8. Níveis de ET-1 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos controles, não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina.	30
Figura 9. Níveis de NGF (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina.	31
Figura 10. Níveis de ET-1 (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina.	32
Figura 11. Níveis de NO (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina.	33
Figura 12. Níveis de TNF- α (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratados ou não com bosentan e/ou endotelina.	34
Figura 13. Níveis de IL-10 (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina.	35
Figura 14. Número de parasitos intracelulares em cardiomiócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina.	36
Figura 15. Porcentagem de cardiomiócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , não tratados e tratados com bosentan e/ou endotelina	36

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Bovina Sérica
CCC	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CD4+	Linfócito T CD4+
CD8+	Linfócito T CD8+
CEBIO	Centro de Bioterismo do ICB/UFMG
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F12
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECE	Enzima de conversão de Endotelina
EDTA	Ácido Diamino-etano-tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ET-1	Endotelina 1
ET-2	Endotelina 2
ET-3	Endotelina 3
ETA	Receptor de Endotelina do Tipo A
ETB	Receptor de Endotelina do Tipo B
FGF b	Fator de crescimento fibroblástico b
FITC	Fluoresceína Iso-tio-cianato
GDNF	Fator de Crescimento Derivado da Glia
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
ICB/UFMG	Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferon γ
LLC-MK2	Células da linhagem de fibroblasto de rim de macaco

MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NGF	Fator de Crescimento Neural
NK	Células Natural Killer
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PBS	Salina tamponada
P-Selectina	Selectina do tipo P
SFB	Soro Fetal Bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TrKa	Receptor Tirosina Hidroxilase do tipo A
VCAM-1	Proteína de adesão vascular do tipo 1
WHO	World Health Organization

RESUMO

Endotelina-1 desempenha papel importante na regulação de funções cardiovasculares e tem sido relacionada a diversas patologias cardiovasculares, como hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca, participando efetivamente na instauração de processos inflamatórios nessas condições. Vários tipos celulares podem secretar endotelinas, entre eles o cardiomiócito. Níveis elevados de ET-1 ocorrem no soro de pacientes com cardiomiopatia chagásica e várias evidências apóiam a participação de endotelinas na sua patogênese. Na infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*, descreve-se elevação dos níveis séricos e teciduais de ET-1, assim como alteração na expressão de seus receptores. O bloqueio dos receptores de ET-1 em ratos infectados com *T. cruzi* aumenta a parasitemia, altera o padrão do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco e aumenta a taxa de infecção de macrófagos em cultura. No presente trabalho, avaliamos o efeito do tratamento de cardiomiócitos infectados ou não, *in vitro*, com cepa Y de *T. cruzi* e tratados ou não com bosentan e/ou ET-1. O tratamento com ET-1 e o duplo tratamento promoveram aumento dos níveis de NGF no sobrenadante de cardiomiócitos controles 48 horas após o tratamento. Maiores níveis de ET-1 foram detectados em sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos controles após os tratamentos, com maior nível sendo detectado após tratamento com bosentan. Níveis de citocinas não foram detectados em sobrenadantes de cardiomiócitos controles, com exceção de TNF- α , cujos níveis foram elevados após o tratamento duplo. A infecção aumentou os níveis de NGF, sendo que após tratamento com bosentan ou após tratamento duplo os níveis se tornaram ainda mais elevados. Cinética semelhante foi observada para a ET-1, cujos maiores níveis foram detectados após tratamento com bosentan e tratamento duplo. Todos os tratamentos elevaram os níveis de NO com 48 horas de infecção em relação ao controle. Níveis de TNF- α foram detectados com 48 horas de infecção em todos os grupos. Já os níveis de IL-10 estavam aumentados 24h após tratamento com ET-1. O duplo tratamento provocou maior elevação do nível dessas citocinas, tanto no grupo controle quanto no grupo infectado. A taxa de infecção e o número de parasitos por células alteraram-se apenas após duplo tratamento. Em conjunto, esses resultados reforçam o papel da ET-1 na resposta do cardiomiócitos à infecção com *T. cruzi*.

ABSTRACT

Endothelin-1 (ET-1) plays an important role in regulation of cardiovascular functions, and has been implicated in cardiovascular diseases, such as hypertension, atherosclerosis, and heart failure, particularly in the inflammatory process occurring during these pathologies. Several cellular types are able to secrete ET-1, among them cardiomyocytes. Patients with chagasic cardiomyopathy present elevated serum levels of ET-1 and evidences point to a role of endothelins in the pathogenesis of the disease. During experimental *Trypanosoma cruzi* infection high serum levels of ET-1 are also described as well as an altered expression of its receptors. Dual blockade of ETA and ETB receptors in rats provokes an elevation of parasitemia and a shift of the inflammatory profile in cardiac tissue. *In vitro*, the dual blockade causes an augment of intracellular parasites in macrophages. In this study, we evaluated the effects of treatment with ET-1 and bosentan, a dual antagonist of ET-1 receptors, on cardiomyocytes infected *in vitro* with Y strain of *T. cruzi*. Levels of NGF were elevated in the supernatants of control cultures 48 hours after treatments with ET-1 or with bosentan followed by ET-1. Higher levels of ET-1 were detected after bosentan treatment and after double treatment, but with higher levels after bosentan treatment. Cytokines were not detected in the supernatants of control cultures, except for TNF- α , that was detected after double treatment. The infection provoked an elevation of NGF levels in the supernatants of all groups evaluated, with higher levels after bosentan or double treatment. Similar kinetics was seen for ET-1 levels. NO was detected only in infected cultures, with higher levels after 48 hours of infection. TNF- α was detected only in cultures with 48 hours of infection, except after double treatment, when the cytokine was detectable in both times, 24 and 48 hours of infection. Concerning IL-10, the treatment with ET-1 elevated their levels 24 hours after infection. The double treatment provoked a higher level of TNF- α and IL-10 in both, control and infected cultures. Double treatment also induced higher percentage of infected cells and higher infection rate. Altogether these results reinforce the role of ET-1 in the response of cardiomyocytes to *T. cruzi* infection.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é um importante problema de saúde pública na América Latina tendo em vista o impacto da morbidade sobre a população e o risco de mortalidade. Em 2010, a Organização Mundial de Saúde estimou que aproximadamente 10 milhões de pessoas estivessem infectadas pelo parasito e mais de 25 milhões estavam sob risco de infecção (WHO, 2010)

A transmissão natural do *T. cruzi* para o homem ocorre através da deposição de fezes de triatomíneos, inseto barbeiro vetor do parasito, infectadas com as formas tripomastigotas metacíclicas, sobre a pele ou sobre mucosa oral ou ocular (Fig.1).

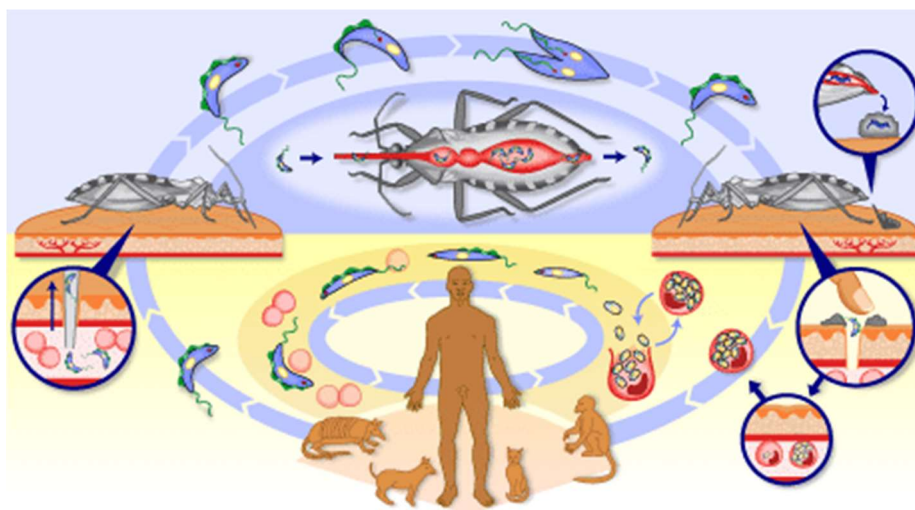


Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. A parte superior mostra a contaminação de triatomíneo pelo sangue de mamífero infectado e a proliferação e diferenciação de tripomastigotas no intestino posterior desse inseto. Tripomastigotas metacíclicos liberados nas fezes do triatomíneo infectam o hospedeiro vertebrado em regiões de solução de continuidade de pele ou em mucosas. A parte inferior mostra a invasão de células do hospedeiro, a multiplicação sob a forma de amastigotas e o rompimento da célula parasitada, com liberação de formas tripomastigotas que circulam pelo sangue. (Retirado de <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>).

A transmissão também pode ocorrer por via congênita, transplante de órgãos, transfusão sanguínea, acidentes de laboratório e por via oral. O *Triatoma infestans*, único triatomíneo exclusivamente doméstico, já foi eliminado do Brasil, Chile e Uruguai, devido a programas de controle sistemático e erradicação do inseto vetor, implantados em diferentes países da América Latina; embora alguns autores ainda acreditem que existam focos residuais desse vetor (Silveira, 2011). A transmissão natural tende a diminuir na América Latina, assim como a transmissão por transfusão sanguínea, embora esta última via seja ainda grave na

Bolivia (Coura e Dias, 2009). Por outro lado, a transmissão oral tem crescido em locais de grande consumo de açaí e outros alimentos *in natura*, como na região Amazônica, e constitui um desafio para o controle da disseminação dessa infecção. Somente no estado do Pará relataram-se 178 casos de infecção em 2006 (Nóbrega *et al.* 2009; Silveira, 2011). No Brasil, o risco de transmissão congênita em gestantes infectadas é baixo, em torno de 1%, mas pode ser maior em outros países da América Latina (Coura et al. 2011).

Distinguem-se duas fases na doença de Chagas, aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se por parasitemia patente (tripomastigotas circulantes) e ninhos de amastigotas (forma proliferativa do parasito) em diferentes tipos celulares, principalmente células musculares cardíacas, esqueléticas e lisas (Tanowitz *et al.*, 1992; Dias *et al.*, 2002). Clinicamente, o paciente pode apresentar febre, mialgia, mal estar, dores musculares, hepatoesplenomegalia, dentre outros sintomas nessa fase, porém a maioria apresenta sintomas semelhantes a uma gripe ou não apresenta qualquer sintoma (Prata, 2001; Billate *et al.*, 2008). Posteriormente à fase aguda, instala-se a fase crônica da doença, na qual 60 a 70% das pessoas infectadas são assintomáticas, apresentando a forma latente ou indeterminada. De modo geral, considera-se que cerca de um terço dos infectados desenvolve eventualmente a forma cardíaca crônica, uma cardiomiopatia dilatada inflamatória que pode levar à morte por arritmia ou insuficiência cardíaca congestiva. Entre 8 e 10% dos pacientes desenvolvem a forma digestiva, caracterizada principalmente por megaesôfago e/ou megacolon. A forma digestiva também pode ocorrer em pacientes com a forma cardíaca (revisões em Tanowitz et al, 1992; Prata, 2001; Teixeira et al, 2006). Entretanto, a prevalência e a gravidade das formas clínicas dessa infecção são variáveis nos diferentes países da América Latina ou em regiões distintas de um mesmo país (Prata, 2001). Em alguns países, como o Panamá e a Venezuela, a infecção se manifesta exclusivamente na forma cardíaca. No Brasil, Argentina e Chile, as manifestações clínicas são bastante variadas (Atias, 1969; Coura et al., 1983; Minoprio, 1966). Na Bahia predomina a forma cardíaca; em Goiás, a forma digestiva e no estado de Minas Gerais, observa-se elevada frequência de formas mistas, cardíaca e digestiva.

Embora a doença de Chagas tenha sido caracterizada em 1909 pelo médico Carlos Chagas - que identificou seu agente etiológico, o ciclo de transmissão e aspectos clínicos dessa infecção - ainda não estão elucidados os mecanismos patogênicos subjacentes à instalação das formas clínicas, assim como a heterogeneidade em sua distribuição geográfica (revisto por Tanowitz et al. 1992; Prata 2001). Fatores associados ao hospedeiro e à diversidade genética das populações do *T. cruzi* podem estar envolvidos (Andrade et al., 1999, 2002; Gomes et al., 2003; Macedo & Pena 1998; Macedo et al., 2004; Miles et al., 1977).

Nessa introdução, enfocaremos os principais aspectos referentes ao acometimento do coração na infecção pelo *T. cruzi*, seja humana seja experimental. A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a forma clínica mais importante da doença de Chagas devido à morbidade e mortalidade e ao conseqüente impacto social (revisto por Higuchi *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2009). Arritmias, tromboembolismo, bloqueios de condução e insuficiência cardíaca estão entre os sintomas observados nos pacientes com cardiopatia chagásica. A variabilidade clínica da CCC constitui um desafio para o prognóstico da evolução da disfunção cardíaca (Rocha *et al.*, 2003). Esta forma clínica da doença está associada a maior risco de morte quando comparada com insuficiência cardíaca de etiologias distintas (Nunes *et al.*, 2010).

Vários fatores têm sido apontados como relevantes para o desenvolvimento da CCC: lesão do miocárdio devido à resposta imunológica exacerbada, desnervação autonômica, distúrbios microvasculares e danos resultantes da persistência do parasito no tecido cardíaco. (Marin-Neto *et al.*, 2007). Em relação à microcirculação, alterações isquêmicas, inflamação perivascular e trombos em vasos do ápice do coração estão entre as alterações descritas (Ramos & Rossi, 1999). Os distúrbios microvasculares podem estar associados à oclusão de pequenos vasos coronários por trombo plaquetário, agressão das células endoteliais pelo próprio parasito, além do dano causado por fatores humorais. Como exemplo da ação de fatores humorais, tem-se a produção de neuraminidase, que remove o ácido siálico das membranas das células endoteliais e do miocárdio e age como fator protetor da superfície celular; e do tromboxano A₂, que aumenta a aderência e adesão plaquetária (Hiss *et al.*, 2009).

A evolução da CCC afeta a morfologia do miocárdio, tendo sido descritas desorganização de miofibrilas, hipertrofia e morte de cardiomiócitos em paralelo à instalação de processo inflamatório e de fibrose. A miocardite é uma das principais características histopatológicas da CCC, com predomínio de células mononucleares. Linfócitos T CD8⁺, alguns expressando granzima A, predominam no infiltrado inflamatório; células NK e macrófagos TNF⁺ também estão presentes (Reis *et al.*, 1993). Por sua vez, Milei *et al.* (1992) ressaltam a presença significativa de macrófagos em biópsias de endocárdio de pacientes chagásicos crônicos. Embora tenha sido aventado o caráter autoimune da cardiopatia chagásica crônica (Leon & Engman, 2001; Kierszenbaum, 2003), a importância da persistência do parasito para a evolução das alterações fisiopatológicas cardíacas tem sido crescentemente realçada (Higuchi *et al.* 1997; Zhang & Tarleton, 1999; Tarleton, 2001; Benvenuti *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2009).

Pacientes com cardiopatia chagásica apresentam níveis mais elevados de IFN- γ circulante que pacientes com cardiopatia de outras etiologias (Cunha Neto et al., 2005). Células mononucleares isoladas de sangue de pacientes com CCC apresentam maior produção de Interferon gama (IFN- γ) quando comparados com pacientes na fase indeterminada. Por sua vez, células mononucleares de pacientes com a forma clínica indeterminada da doença produzem maiores níveis de IL-10 que os pacientes com CCC.

Os níveis de TNF- α estão aumentados na fase crônica da infecção, tanto indeterminada como cardíaca (Cunha-Neto et al., 1998; Llaguno et al., 2010), porém células mononucleares de pacientes com a forma indeterminada podem produzir níveis mais elevados de TNF- α quando comparados aos de pacientes com CCC. Essa diferença na produção do TNF- α pode estar associada ao polimorfismo do seu gene, somado a tipos específicos de células imunes no infiltrado inflamatório. Além disso, os níveis de TNF- α , apesar do seu papel fundamental na eliminação do parasito, podem também regular a produção de IL-10 (Pisetti, et al. 2011). Segundo Higuchi et al. (2003), a IL-10 pode induzir menor produção de IFN- γ , óxido nítrico (NO) por macrófagos e diminuição da expressão de MHC de classe II. Níveis de IL-17, IL-13, IL-2 e IL-4 estão diminuídos em pacientes com CCC; já os níveis de IL-12 podem estar aumentados. Além disso, níveis de IL-6 estão diminuídos em pacientes chagásicos na fase indeterminada da patologia (Cunha-Neto, et al. 1998; Llaguno, et al. 2010).

Em conjunto, os dados acima apontam para a importância do perfil da resposta imune na patogênese da CCC. De modo indireto, citocinas podem afetar a produção de fator natriurético atrial e, desse modo, contribuir para a hipertrofia de cardiomiócitos (revisão em Marin-Neto et al., 2009). Para Dutra & Gollob (2008), o perfil de células inflamatórias no coração e de citocinas por elas produzidas, no início da infecção, é fator determinante para o estabelecimento da insuficiência cardíaca, relacionando-se com o perfil subsequente da população de células T efetoras e reguladoras e, conseqüentemente, com o controle do parasito.

A Figura 2 representa, de modo esquemático, células e moléculas relacionadas ao processo inflamatório no coração durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas.

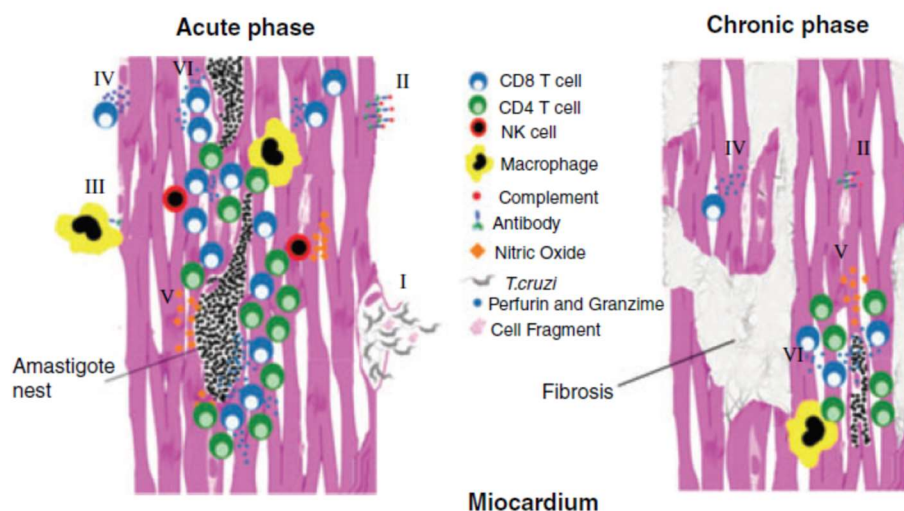


Figura 2. Representação esquemática do perfil de células inflamatórias no miocárdio durante as fases aguda e crônica da infecção com *T. cruzi* (Retirado de Gutierrez *et al.*, 2009).

A densidade de fibras nervosas cardíacas autonômicas, tanto colinérgicas quanto noradrenérgicas torna-se bastante reduzida em pacientes com cardiomiopatia chagásica dilatada (Machado C *et al.* 2000). Estudos em autópsias de pacientes chagásicos evidenciaram redução importante de corpos neuronais nos gânglios parassimpáticos cardíacos (Köberle 1968; Tanowitz *et al.* 1992). Por sua vez, a redução de pericários neuronais de gânglios simpáticos na doença de Chagas tem sido pouco estudada. Alguns autores mostram destruição neuronal nos gânglios estrelados de pacientes chagásicos crônicos (Alcântara, 1970; Almeida *et al.*, 1986). O dano ao sistema nervoso autônomo, em especial o parassimpático, pode contribuir para a elevada taxa de morte súbita entre os pacientes cardiopatas (Machado C *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2002). O fenômeno de disautonomia é considerado de ocorrência precoce, ocorrendo nos pacientes com a forma indeterminada da doença ou sem cardiopatia (Ribeiro *et al.*, 2001; Junqueira & Soares, 2002; Molina *et al.*, 2006).

A utilização de modelos experimentais tem contribuído para o esclarecimento de diferentes aspectos da doença de Chagas, em especial a resposta imune. A resistência do hospedeiro à infecção depende tanto da imunidade inata quanto da adquirida e envolve a participação de diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, células NK, células T CD8⁺ e CD4⁺ e linfócitos B. O recrutamento de células inflamatórias depende, entre outros fatores, da produção de citocinas e quimiocinas no tecido (revisão em Gutierrez *et al.*, 2009). Leucócitos ativados por *T. cruzi* produzem quantidades expressivas de IFN- γ , IL-10,

IL-12 e TNF- α (Gazinelli et al., 1992; Silva et al., 1991; 1992; Aliberti et al., 1996), assim como NO (Silva et al., 2003). Tem sido demonstrado que INF- γ e TNF- α estão diretamente envolvidos na resposta ao *T. cruzi* (Silva et al., 1995; Aliberti et al., 2001). Em associação com TNF- α , INF-gama induz a produção de óxido nítrico por macrófagos e inibe a proliferação do parasito (Vespa et al. 1994). Cardiomiócitos também participam na resposta à infecção por *T. cruzi*, através da produção de óxido nítrico, quimiocinas, como JE, RANTES, KC, MIP-2, Mig, and Crg-2 e citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (Machado F et al., 2008)

Como usual em respostas inflamatórias, na infecção por *T. cruzi*, IL-10 e IL-4 modulam a produção de citocinas pro-inflamatórias (Silva et al, 1992; Soares et al, 2001), de NO (Almeida et al, 2000) e de quimiocinas, sendo estas também controladas pelo fator de crescimento transformante (TGF)- β (Aliberti et al, 2001). Produção exacerbada de citocinas pro-inflamatórias (Chandra et al, 2002a; Gomes et al, 2003; Talvani et al, 2004) e de NO (Chandra et al, 2002b; Silva et al, 2003) pode causar dano tecidual.

O NO é gerado pela ação de enzimas da família NO sintase (NOS) - NOS endotelial, NOS neuronal e NOS constitutiva - sendo todas expressas por cardiomiócitos, dependendo do estímulo ao qual são submetidos. Além da sua função tripanocida, o NO possui efeitos fisiológicos, agindo como mediador de diferentes fenômenos biológicos, como modulação da resposta contrátil do miocárdio, fator anti-hipertrofico e pró-apoptótico (Simojo et al, 2005). Ainda, NO pode ser importante mediador inflamatório por induzir aumento da expressão de ICAM no tecido cardíaco, regular a produção de quimiocinas e ser quimiotático para leucócitos (Frangogiannis et al., 2009; Machado et al, 2008). Níveis exacerbados de NO podem ser prejudiciais, levando a disfunções cardíacas, como miocardite e infarto do miocárdio (Fichera et al., 2004). O bloqueio da produção de NO resulta em aumento da parasitemia e da mortalidade de camundongos infectados, bem como aumento do parasitismo de células musculares cardíacas em cultura, mesmo quando estimuladas por outras citocinas (Fichera et al., 2004; Simojo et al., 2009).

Em modelos experimentais, durante a fase aguda da infecção, ocorre degeneração de terminações nervosas autonômicas em diferentes órgãos, porém mais grave no coração (Machado et al, 1975; 1979; 1987; Guerra et al, 2001; Camargos et al, 2000). Em ratos infectados com cepa Y de *T. cruzi*, a desnervação cardíaca é acentuada, com lesão das terminações nervosas pós-ganglionares tanto simpáticas quanto parassimpáticas. Os níveis de noradrenalina no órgão reduzem-se a valores não detectáveis (Machado et al., 1975), com o desaparecimento das terminações noradrenérgicas no mesmo período (Machado & Ribeiro

1989). A desnervação simpática do coração não resulta da morte ou parasitismo de neurônios simpáticos pós-ganglionares nos gânglios simpáticos cervicais (Camargos & Machado, 1988). A desnervação colinérgica não é total no coração e está associada à redução significativa dos níveis do neurotransmissor acetilcolina e da enzima responsável pela sua síntese, a colina acetiltransferase (Machado et al., 1979, 1987). Os fatores responsáveis pela destruição das terminações nervosas durante a fase aguda da infecção não são completamente conhecidos. O parasitismo neuronal (Köberle, 1968) e substâncias tóxicas liberadas pelo parasito (Teixeira et al., 1980; Guerra et al., 2001) não são considerados importantes. Por outro lado, a presença de células inflamatórias no tecido cardíaco parece ter papel importante na desnervação autonômica do coração (Mello & Machado, 1998; Machado & Ribeiro, 1989; Guerra et al., 2001). Estudos apontam o envolvimento de reações imunes no processo degenerativo, através de anticorpos auto-reativos e por reação cruzada, devido a mimetismo molecular. Alguns consideram importante a adsorção de antígenos do *T. cruzi* à membrana da superfície neuronal (Ribeiro-Santos & Hudson, 1981; Petry & Eisen, 1989; Kalil & Cunha Neto, 1996).

Na fase tardia da infecção experimental em ratos ocorre regeneração das terminações nervosas autonômicas, com conseqüente recuperação gradual do padrão de inervação do coração e dos níveis de neurotransmissores no coração (Machado et al., 1978, 1979, 1987). Os fatores responsáveis pela regeneração das fibras nervosa cardíacas não são bem conhecidos, mas sabe-se que a reparação de áreas lesadas do coração envolve a interação de diferentes tipos celulares com a matriz extracelular, como maior expressão de moléculas de adesão, ativação de macrófagos e crescimento de células endoteliais. No caso de macrófagos, estes secretam fatores de crescimento, como o fator de crescimento fibroblástico a, e o Fator de Crescimento Neural (NGF) (Weihrauch et al., 1994). A participação de cardiomiócitos no processo de reparação deve ser fundamental, uma vez que estas células podem secretar fatores de crescimento, como fator de crescimento fibroblástico b (FGF-b), fator de crescimento insulina-símile (IGF), Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF) e NGF (Kardami & Fandrich, 1989; Love & Tucker, 1995; Martinelli et al., 2002). Em ratos chagásicos, durante a fase aguda da infecção, quando ocorre severa desnervação simpática cardíaca, é observado aumento da expressão de NGF, este aumento sendo relacionado à regeneração das terminações nervosas que ocorre na fase crônica da infecção (Martinelli et al, 2006). Ainda, estudos *in vitro* desenvolvidos no Laboratório Profa. Conceição Machado demonstraram que diferentes cepas de *T. cruzi* podem induzir diferentes perfis de produção de NGF por cardiomiócitos (Pinto, 2006).

O NGF é uma neurotrofina reconhecida por exercer papel crítico na diferenciação, sobrevivência e atividade sináptica do sistema nervoso, central e periférico (Levi-Montalcini et al., 1996; Chao, 2003;). Atualmente, diferentes estudos têm demonstrado atuação do NGF em funções que se estendem além daquelas relacionadas ao tecido nervoso, dentre elas estresse, inflamação e remodelagem tecidual (Aloe *et al.*, 2002; Micera *et al.*, 2007; Scuri *et al.*, 2010). As atividades biológicas de NGF são mediadas por duas classes de receptores, o p75, receptor de baixa afinidade pertencente à superfamília de receptores de citocinas, incluindo o receptor para TNF; e TrkA, um receptor tirosina cinase transmembrana. Durante o desenvolvimento e a vida adulta, NGF e seus receptores são produzidos por diferentes tipos celulares, entre eles células do tecido nervoso, células inflamatórias, endoteliais e musculares (Sofroniew *et al.*, 2001; Micera *et al.*, 2007). No coração, o NGF é produzido também por cardiomiócitos e age como fator autócrino de sobrevivência para os mesmos (Caporali *et al.* 2008). Além disso, é demonstrado que NGF promove reparo do tecidual após infarto do miocárdio (Meloni *et al.*, 2010).

Entre os agentes desencadeadores do aumento da expressão de NGF, encontram-se citocinas inflamatórias e endotelina. Embora ainda não tenha sido estabelecida uma relação direta entre a expressão de citocinas e a produção de NGF no coração, estudos demonstram que citocinas pró-inflamatórias podem estimular a secreção de NGF. Em camundongos, TNF- α aumenta a secreção de NGF induzida por IL1- β e INF- γ em fibroblastos (Hattori *et al.*, 1994) e por IL-4 em astrócitos (Brodie *et al.*, 1998). Em células de disco intervertebral de humanos, TNF- α e IL1- β também são capazes de estimular a produção de NGF (Abe *et al.*, 2007). De acordo com Takei & Laskey (2008), TNF e NGF estão inter-relacionados em suas atividades e distúrbios no balanço dessas duas moléculas podem levar ao estabelecimento de distúrbios neurodegenerativos e inflamatórias. No que se refere à endotelina-1 (ET-1), estudos *in vitro* mostram que ET-1 aumenta a expressão de NGF em cardiomiócitos e, em concordância, camundongos deficientes em ET-1 mostram expressão reduzida de NGF e da inervação simpática cardíaca (Ieda *et al.*, 2004).

Endotelinas (ET) constituem uma família de peptídeos com três isoformas, denominadas endotelina 1 (ET-1), endotelina 2 (ET-2) e endotelina 3 (ET-3). Nas suas formas ativas, as isoformas apresentam 21 aminoácidos, com pequenas diferenças na seqüência estrutural de suas moléculas (Rubanyi *et al.*, 1994). As moléculas ativas das ET são formadas pela quebra seqüencial de formas inativas produzidas pela célula. A pré-pro-endotelina é hidrolisada em big-endotelina que, após nova quebra, dará origem à forma ativa da molécula. O processamento dessas formas não ativas é realizado pela Enzima de Conversão em ET

(ECE) e por outras enzimas tais como cinases, metaloproteases não ECE e endopeptidases (Rubanyi *et al*, 1994).

ET-1 é um potente vasoconstritor secretado por células endoteliais e vários outros tipos celulares, entre eles cardiomiócitos, macrófagos, células musculares lisas, neurônios e células da glia (Miyauchi & Masaki, 1999; Ripodas *et al*, 2001; Sluck *et al*, 1999; Naicker & Bhoola, 2001). ET-2, por sua vez, é potente constritor da musculatura intestinal e é expresso principalmente no trato gastrointestinal (De La Monte *et al*, 1995). ET-3 é abundante no trato gastrointestinal, hipófise e cérebro (Matsumoto *et al* 1989; Sluck *et al*, 1999). A ET-1 é a isoforma predominantemente responsável por efeitos cardiovasculares, enquanto a ET-2 está envolvida com o desenvolvimento neonatal e funções intestinais. ET-3, por sua vez, desempenha papel importante na diferenciação de melanócitos e neurônios entéricos (Kedzierski & Yanagisawa, 2001). De modo geral, ET exercem importantes atividades fisiológicas e fisiopatológicas em diversos sistemas orgânicos, incluindo os sistemas renal, pulmonar, imunológico e cardiovascular, além de atuarem no processo de desenvolvimento embriológico. ET possuem ações pro-inflamatórias, mitogênicas e no controle da hemostasia, entre outras (revisões em Miyauchi & Masaki, 1999, Giannessi *et al.*, 2001, Brunner *et al*, 2006; Schneider *et al*, 2007). Com relação ao seu papel na inflamação, ET participam dos processos de formação de edema, infiltração leucocitária e febre (Rae e Henriques, 1998; Sampaio *et al*, 2004); inflamação dependente de mastócitos (Metz *et al*, 2006); e expressão de moléculas de adesão para recrutamento de leucócitos por células endoteliais (Callera *et al*, 2004). Sabe-se que macrófagos podem produzir endotelinas (Wahl *et al*, 2005) e expressar seus receptores, ET_A e ET_B (Sakura-Yamashita *et al*, 1997; Kedzierki & Yanagisawa, 2001).

Os receptores de endotelina, ET_A e ET_B, medeiam os efeitos de ET em mamíferos (Brunner *et al*, 2006; Schneider *et al*, 2007). Esses receptores estão acoplados à proteína G e quando estimulados provocam o aumento da concentração de cálcio no interior da célula, que promove a ativação de proteína cinase C e o aumento ou diminuição de AMPc na célula (Yang *et al*, 2005; Kedzierski *et al*, 2001). As ET possuem vias de ligação diferentes, sendo que as isoformas ET-1 e ET-2 ligam-se em ambos os receptores, porém a isoforma ET-3 liga-se especificamente no receptor ET_B (Kedzierski *et al*, 2001). O receptor ET_A é expresso em células musculares, células hepáticas, neurônios, osteoblastos, adipócitos, melanócitos e queratinócitos. Já o receptor ET_B é expresso em células endoteliais, musculares, hepáticas, células do epitélio renal, osteoblastos e neurônios do sistema nervoso periférico. Ambos os receptores são expressos nas células do trato reprodutor (Kedzierski *et al*, 2001; Rubanyi *et al*, 1994). Em músculo liso vascular, ambos os receptores medeiam vasoconstrição. Nas

células endoteliais, os receptores ETB provocam vasodilatação, através da produção de óxido nítrico (NO).

Endothelin pathway — Molecular Components

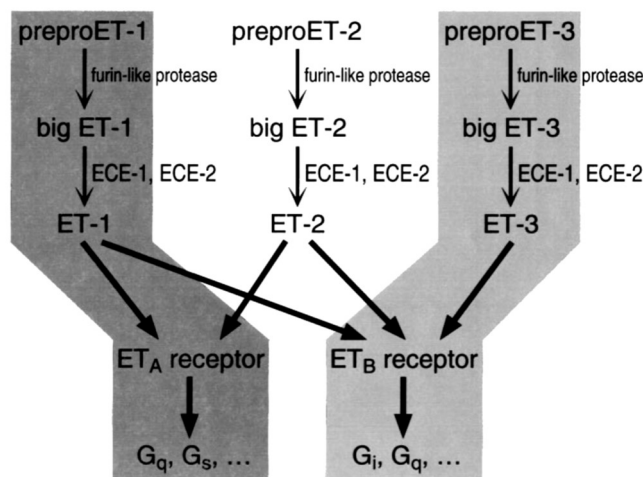


Figura 3. Representação esquemática das vias de formação e de ligação a receptores da endotelina (Retirado de Kedzierski *et al.*, 2001)

A ET-1 está envolvida com funções cardiovasculares normais, além de diversas patologias cardiovasculares, como hipertensão, aterosclerose e insuficiência cardíaca (Kedzierski & Yanagisawa, 2001, Gianessi *et al.*, 2001; Böhm & Pernow, 2007). Estudos experimentais mostram que, no coração, ET-1 potencia a resposta contrátil induzida pela noradrenalina (Backs *et al.*, 2005), além de modular a síntese de peptídeo natriurético B (BNP) por cardiomiócitos (Bruneau *et al.*, 1997). Por outro lado, ET-1, via receptor ETA possui participação no processo de reinervação simpática que ocorre após infarto do miocárdio (Lee *et al.*, 2008) e, em ratos hipertensos, tanto a ET-1 quanto seu receptor ETA estão envolvidos no recrutamento de leucócitos e aumento da expressão de VCAM-1 e P-selectina (Callera *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado papel importante da ET-1 nos processos inflamatórios de patologias cardiovasculares, como no recrutamento de monócitos e sua proliferação, que constituem eventos importantes na disfunção e remodelamento ventricular e, portanto, no estabelecimento de cardiomiopatia (Yang *et al.*, 2005). Além disso, células inflamatórias como os macrófagos são capazes de sintetizar e secretar endotelina e desta forma contribuem para a amplificação e regulação da resposta inflamatória (Liu *et al.*, 1998). O aumento da síntese de ET-1 pode levar ao aumento na síntese de citocinas e quimiocinas e vice-versa (White *et al.*, 2000). Importante ressaltar que cardiomiócitos não

somente secretam ET-1 como expressam os receptores ETA e ETB, com ETA representando 90% dos seus receptores (Fareh *et al*, 1996; Sakai *et al*, 1996; Yang *et al*, 2005).

Níveis elevados de ET-1 ocorrem em pacientes com cardiomiopatia chagásica (Salomone *et al*, 2000) e, na última década, têm surgido evidências que apóiam a participação de endotelinas na patogênese da doença (revisões em Petkova *et al*, 2001; Tanowitz *et al*, 2005; Machado & Camargos). Na fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi* em camundongos, há elevação dos níveis cardíacos de endotelinas paralelamente a alterações vasculares (revisão por Petkova *et al*, 2001). Em ratos, também foi verificado que, na fase aguda da infecção com *T. cruzi*, há elevação dos níveis cardíacos de ET-1, associada com a disfunção vascular característica da infecção (Camargos *et al*, 2002). Em outro estudo, também em ratos infectados com *T. cruzi*, o bloqueio específico do receptor ETA reverteu a disfunção vascular, no entanto aumentou o parasitismo no coração e diafragma, sugerindo papel de ET no controle inicial da infecção (Camargos *et al*, 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados no laboratório Profa Conceição Machado sugerem que a endotelina tem participação no controle da resposta de resistência à infecção por *T. cruzi*, através do desenvolvimento do processo inflamatório, em especial da participação de macrófagos, que resulta no controle do parasitismo durante a fase aguda da infecção. O bloqueio dos receptores de endotelina em ratos infectados aumenta a parasitemia durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* em ratos, enquanto que no diafragma e coração o bloqueio reduz a área ocupada por linfócitos T e B e, ao contrário, aumenta o número de células “Natural killer”. Já o bloqueio dos receptores de endotelina em macrófagos peritoneais de ratos infectados por *T. cruzi*, em cultura, aumentou a taxa de infecção e o número de parasitas no interior dessas células. Ainda, o tratamento com endotelina-1 reduz a produção de óxido nítrico e das citocinas TNF- α e IL-10 por macrófagos infectados, reforçando o papel da endotelina no controle da resposta imunológica de resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi* (Marques, 2008).

Neste trabalho, pretendemos avaliar os efeitos da endotelina sobre a infecção, *in vitro*, de cardiomiócitos. Para isso, o delineamento experimental envolve o tratamento dessas células com endotelina-1 ou com bosentan. O bosentan (Ro 47-0203, Actelion) é antagonista não-peptídico competitivo de endotelina, sendo considerado ferramenta útil no estudo de sistemas biológicos envolvendo a endotelina. O tratamento com fármaco pode ser agudo ou crônico e o mesmo é capaz de bloquear a ação das endotelinas através de seus dois tipos de receptores, ETA e ETB, o que o caracteriza como bloqueador dual. A afinidade do bosentan para o receptor ETA é 100 vezes maior do que para o ETB. Em pacientes, após administração oral, a concentração plasmática máxima do bosentan é alcançada dentro de 3 a 5 horas. O

tratamento clínico com o fármaco demonstra melhoras em casos de insuficiência cardíaca, vasoespasma cerebral, aneurismas, hipertensão pulmonar e outras doenças [Roux *et al.*, 1999]. Em dezembro de 2001, o fármaco foi aprovado para uso clínico pelo FDA (*Food and Drug Administration*, Administração de Alimentos e Drogas) para tratamento de hipertensão pulmonar arterial [Motte *et al.*, 2005]. Em modelos experimentais, bosentan é utilizado tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*, para análise de diferentes aspectos da ação biológica da endotelina, como hipertrofia e inflamação (Izumi *et al.*, 2003; Marques, 2008; Stillitano *et al.*, 2008).

Diante do exposto, considerando que cardiomiócitos apresentam receptores para endotelina e que esta é fator significativo no desenvolvimento da disfunção vascular e da cardiomiopatia chagásica, torna-se importante o estudo da ação da endotelina na atividade secretora desse tipo celular, em resposta à infecção pelo *T. cruzi*. Tal investigação pode contribuir para a ampliação do conhecimento sobre o papel de cardiomiócitos nos diferentes fenômenos que ocorrem durante a infecção, como resistência ao parasito, inflamação, desnervação, remodelamento tecidual (hipertrofia e fibrose), entre outros.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito do tratamento com endotelina-1 (ET-1) sobre a expressão de NGF, NO e citocinas por cardiomiócitos infectados ou não, *in vitro*, com *T. cruzi*.

2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de NGF, ET-1, NO, TNF- α , IL-1 β , INF- γ e IL-10 nos sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y de *T. cruzi* e tratados ou não com ET-1;
- Avaliar os níveis de NGF, ET-1, NO, TNF- α , IL-1 β , INF- γ e IL-10 nos sobrenadantes de culturas de cardiomiócitos infectados ou não com cepa Y de *T. cruzi* e tratados ou não com antagonista de receptores ETA e ETB;
- Avaliar a taxa de infecção de cardiomiócitos tratados ou não com ET-1 ou com antagonista de receptores ETA e ETB;
- Avaliar o percentual de cardiomiócitos infectados após tratamento com ET-1 ou com antagonista de receptores ETA e ETB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman neonatos, com idade entre 1 e 3 dias, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sob registro de protocolo nº 081/03.

3.2 Isolamento e cultivo de cardiomiócitos

Os procedimentos experimentais basearam-se na metodologia proposta por Chiopcikova *et al* (2001) modificado por Pinto *et al* (2006). Ratos neonatos foram sacrificados por decapitação e seus corações foram imediatamente retirados do tórax e mantidos em solução de Ringer em temperatura ambiente. Após limpeza e eliminação das câmaras atriais, os corações foram fragmentados, transferidos para frasco Erlenmeyer e submetidos a vários (6-10) ciclos de tripsinização com solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco), à temperatura de 37 °C, sob agitação mecânica. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1800 rpm por 10 minutos e o pellet resultante foi ressuspenso em meio DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F12 - GIBCO) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 20 %, cloreto de cálcio a 1% e penicilina-estreptomicina a 1%. As células foram plaqueadas em garrafa de cultura (25 cm²) por 2 horas para adesão dos fibroblastos, de modo a obter-se cultura com predominância de cardiomiócitos. A seguir, o sobrenadante foi coletado e o número de células viáveis foi calculado a partir da contagem de células em câmara de Neubauer, após coloração com Azul de Tripán a 0,4% (Sigma). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, com densidade de 3×10^5 células por poço, em meio DMEM/F12 suplementado com SFB a 20%, cloreto de cálcio a 1% e penicilina-estreptomicina a 1%. Três dias após o plaqueamento, quando os cardiomiócitos estavam aderidos, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM/F12 sem SFB. As células permaneceram neste meio por mais três dias, quando foram, então, submetidas aos tratamentos com ET-1 e/ou bosentan e à infecção com cepa Y de *T. cruzi*, conforme descrito a seguir. Os cardiomiócitos foram mantidos, durante todo o procedimento, em estufa com atmosfera umidificada, a 37 °C e 5% de CO₂.

3.3 Caracterização morfológica da cultura de cardiomiócitos

A confirmação da predominância de cardiomiócitos nos poços foi feita mediante: i) observação, em microscópio Axiovert 25 Zeiss, de contração espontânea e formação de

sincício; ii) identificação imunocitoquímica de alfa-actinina e iii) caracterização da ultraestrutura em microscópio eletrônico de transmissão.

3.3.1 Imunofluorescência para alfa-actinina

Cardiomiócitos foram plaqueados como descrito anteriormente em lamínulas circulares. No sexto dia de cultivo (terceiro dia com meio DMEM-F12 sem SFB), as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% em PBS suplementado com cálcio e magnésio, por uma noite a 4 °C. Após a fixação, as células foram incubadas por 20 minutos em solução de PBS contendo saponina a 0,5% (Sigma) e BSA a 2% (Sigma). Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-alfa-actinina (Sigma), diluição 1:1000, por 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com solução PBS/saponina/BSA, as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fluoresceína (FITC; Santa Cruz Biotechnology) em diluição 1:250. A seguir, procedeu-se à coloração dos núcleos com 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) diluído 1:100 em PBS. A análise das células foi realizada em microscópio de fluorescência Axioplan-2 da Zeiss (objetiva de imersão com aumento de 63X).

3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Cardiomiócitos foram plaqueados como descrito anteriormente em lamínulas circulares. No sexto dia de cultivo (terceiro dia com meio DMEM-F12 sem SFB), as células foram lavadas com PBS suplementado com cálcio e magnésio por 2 vezes e fixadas com solução modificada de Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato a 0,1 M, pH 7,2). Após a fixação, as células foram lavadas com tampão cacodilato a 0,1M e incubadas com tetróxido de ósmio a 2% reduzido com ferrocianeto a 1% em tampão cacodilato 0,1M, em temperatura ambiente e sob capela de exaustão, por 1 hora. A seguir, as células foram lavadas com tampão cacodilato 0,1 M e raspadas do fundo da placa. O raspado foi centrifugado e o pellet resultante foi incubado em solução de uranila a 0,5% em água por uma noite. Após esse procedimento, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas com água e centrifugadas. O pellet foi incluído em agarose a 2% e seccionado em fragmentos de aproximadamente 1mm³, os quais foram submetidos a processo de desidratação progressiva.

Após a desidratação, os fragmentos foram infiltrados com mistura de acetona com resina Epon nas proporções de 2:1 e 1:1, por 1 hora cada e, então, na proporção de 1:2 por uma noite, com o recipiente aberto. Posteriormente, os fragmentos foram transferidos para mistura plena de EPON por 1 hora e incluídos na mesma resina. O material foi transferido

para estufa à 40 °C por 1 hora e então para estufa à 60 °C por 48 horas para polimerização da resina. Cortes semi-finos (300nm) foram transferidos para lâmina de vidro e corados com solução de toluidina para seleção, em microscópio óptico, de áreas de interesse. Cortes ultra-finos (50nm) foram transferidos para telas de cobre (200 mesh), contrastados com citrato de chumbo e analisados em microscópio Tecnai G2-Spirit (FEI Company, Holanda)

3.4 Avaliação da viabilidade celular

No sexto dia de cultivo (terceiro dia com meio DMEM-F12 sem SFB, o meio foi substituído por meio DMEM-F12 contendo diferentes concentrações de ET-1 ou de bosentan, de modo a se obter pelo menos três poços com cada uma das concentrações usadas. Para ET-1, foram usadas as concentrações de 10^{-6} M, 10^{-7} M e 10^{-8} M em meio DMEM-F12. Para bosentan, as concentrações utilizadas foram 10^{-4} M, 10^{-5} M e 10^{-6} M em meio DMEM-F12. Cardiomiócitos controles, ou seja, não tratados, também foram submetidos ao teste de viabilidade celular por MTT.

Após 24 horas de tratamento, o meio foi removido e, a seguir, adicionada solução constituída por 210 µl de DMEM-F12 isento de SFB e 170 µl de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide, Sigma) na concentração de 5mg/ml. Após 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂, foram adicionados 210 µl de solução SDS (Dodecilsulfato de sódio) em HCl a 10% em água, ficando a placa em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 16 a 18 horas. Células viáveis convertem o sal de tetrazolio (amarelo) em cristais de formazan (púrpura) que é liberado no meio de cultivo após rompimento das células pela ação do SDS. A intensidade da cor foi avaliada por leitura de absorbância a 595 nm (leitor Versamax TM, Molecular Devices), sendo a absorbância diretamente proporcional ao número de células viáveis na amostra.

3.5 Delineamento experimental

Tendo em vista que o objetivo principal desse trabalho é avaliar o efeito da ET-1 sobre a expressão de NGF, NO e citocinas por cardiomiócitos infectados, *in vitro*, com cepa Y de *T. cruzi*, optou-se por tratar essas células com ET-1 previamente à infecção. Adicionalmente, as células foram tratadas com bosentan, antagonista dos receptores ETA e ETB, previamente à infecção com *T. cruzi*. A ligação desse antagonista com seus receptores é irreversível e, desse modo, pretendeu-se avaliar se este bloqueio interfere com a resposta do cardiomiócitos à

infecção. Uma terceira abordagem envolveu o tratamento duplo, ou seja, os cardiomiócitos foram tratados por 24 horas com bosentan, lavados e tratados por 24 horas com ET-1.

Todos os tratamentos foram feitos em cardiomiócitos controles e infectados. Desse modo, as culturas primárias de cardiomiócitos foram conduzidas conforme os seguintes grupos experimentais:

- Grupo 1: Cardiomiócitos controles não tratados;
- Grupo 2: Cardiomiócitos controles tratados com bosentan por 24 horas;
- Grupo 3: Cardiomiócitos controles tratados com ET-1 por 24 horas;
- Grupo 4: Cardiomiócitos controles tratados com bosentan por 24 horas seguido de tratamento com ET-1 por 24 horas;
- Grupo 5: Cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* por 24 ou 48 horas;
- Grupo 6: Cardiomiócitos tratados com bosentan por 24 horas e infectados com cepa Y de *T. cruzi* por 24 ou 48 horas;
- Grupo 7: Cardiomiócitos tratados com ET-1 por 24 horas e infectados com cepa Y de *T. cruzi* por 24 ou 48 horas;
- Grupo 8: Cardiomiócitos tratados com bosentan por 24 horas seguido de tratamento com ET-1 por 24 horas e infectados com cepa Y de *T. cruzi* por 24 ou 48 horas;

Todos os sobrenadantes foram coletados no período correspondente a 24 ou 48 horas de infecção, ou seja, no oitavo e nono dias de cultivo, com exceção do grupo 7 que teve o sobrenadante coletado no nono e décimo dias de cultivo.

3.6 Obtenção dos parasitos e infecção com *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidos do sangue do plexo orbital de camundongos infectados e gentilmente fornecidos pelo Prof Egler Chiari do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Células da linhagem de fibroblastos de rim de macaco (LLC-MK2) mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina foram infectadas com esses parasitos para manutenção da cepa em cultura. Após infecção, o meio das células LLC-MK2 foi substituído por DMEM suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram mantidas em estufas com atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Dois repiques foram feitos antes da utilização dos parasitos nos experimentos. Tripomastigotas liberados das células LLC-MK2 foram coletados em tubo falcon de 50 ml, centrifugados a

2.500 rpm por 10 minutos e levados à estufa com atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Após 4 horas, o sobrenadante foi recolhido para determinação do número de parasitos por ml. Após centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o meio foi substituído por DMEM-F12 isento de SFB.

Os cardiomiócitos, tratados ou não com ET-1 e/ou bosentan, foram infectados com tripomastigotas da cepa Y na proporção de 4 parasitos por cardiomiócito.

3.7 Tratamentos com endotelina 1 e bosentan

Não encontramos na literatura um padrão para o tratamento in vitro com bosentan e/ou endotelina-1, em relação ao tempo e às concentrações utilizadas. Roffê et al. (2007) trataram macrófagos com concentrações de 10⁻⁸ e 10⁻⁹ M de de endotelina e bosentan respectivamente. Isume et al (2003) trataram cardiomiocitos com bloqueador seletivo de ETA na concentração de 10⁻⁶ por 48 horas. Já Harada et al (1997) utilizaram concentração de 10⁻⁵ de bosentan por duas horas em cardiomiócitos. Avaliamos as concentrações de bosentan e ET-1 mais utilizadas na literatura por 24 horas e verificamos, através do teste de ensaio com MTT, que nenhuma das concentrações alteraram a viabilidade celular dos cardiomiócitos. Diante disso, decidimos utilizar, nesse trabalho, o tratamento por 24 horas com o bosentan e ET-1 nas concentrações de 10⁻⁵ e 10⁻⁷ respectivamente.

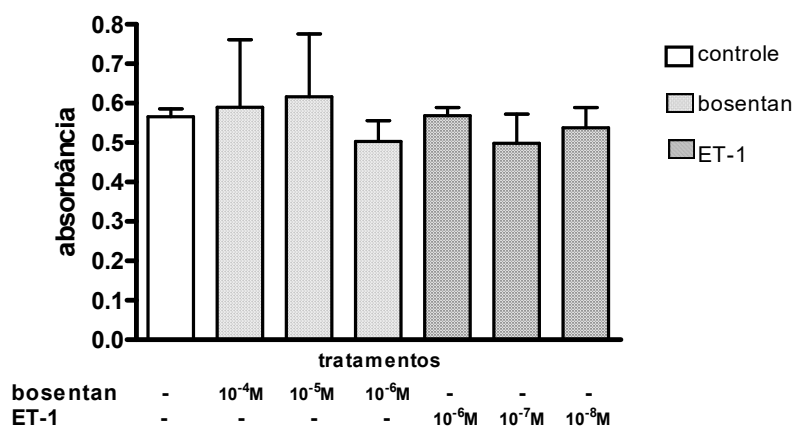


Figura 4. Ensaio de viabilidade por MTT em cardiomiócitos cultivados por seis dias e tratados, por 24 horas, com diferentes concentrações de bosentan (10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M) e ET-1 (10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M).

Cada um dos tratamentos com ET-1 (10⁻⁷ M) ou com bosentan (10⁻⁵ M) foi feito no sexto dia de cultivo, pelo período de 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas

com meio DMEM-F12 sem suplementação com SFB e, a seguir, adicionado o mesmo meio. Alguns dos poços da placa de cultivo foram infectados com cepa Y de *T. cruzi*. O sobrenadante foi recolhido no período de 24 e 48 horas de infecção e armazenado em freezer a -80 C. No caso de tratamento duplo – bosentan e ET-1 - as células foram tratadas inicialmente com bosentan (10^{-5} M) por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas e adicionado meio com ET-1 (10^{-7} M). Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram infectadas ou não com cepa Y de *T. cruzi*.

3.8 Contagem dos parasitos intracelulares

Para a quantificação do número de parasitos no citoplasma de cardiomiócitos no período de 24 ou de 48 horas de infecção, células previamente plaqueadas em lamínulas e tratadas ou não foram fixadas com solução de Bouin, por 5 minutos. Após lavagens com PBS⁺⁺ (suplementado com cálcio e magnésio) e em álcool 70°, as células foram coradas com hematoxilina e eosina. A taxa de infecção (número de parasitos/célula) foi determinada em 15 imagens digitalizadas (correspondentes a, no mínimo, 250 células) obtidas em microscópio Axioplan-2 da Zeiss com objetiva de imersão 63X. Para cada grupo, utilizaram-se dois experimentos distintos. O mesmo procedimento foi utilizado para determinação do percentual de células infectadas.

3.9 Dosagem de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico por cardiomiócitos foi avaliada indiretamente pela dosagem de nitrito no sobrenadante pela técnica de Griess modificada (Green *et al.*,1981). A solução de Griess foi preparada a partir da mistura, na proporção de 1:1vv, de solução de sulfanilamida (Sigma) a 1% e solução de naftilenodiamida (Sigma) a 0.1%, ambas em ácido fosfórico 2.5% (Merck). 50 µL de cada amostra foram distribuídos, em duplicatas, em placa de 96 poços e então adicionou-se 50 µL da solução de Griess. Após 10 minutos, procedeu-se a leitura da absorbância, com comprimento de onda de 550 nm (leitor VersamaxTM, Molecular Devices) e a concentração de nitrito foi determinada tomando como referência a curva padrão, com limites de leitura entre 1,5 e 100 µM de NaNO₂ (nitrito de sódio). Os níveis de nitrito foram expressos em µM. A curva padrão referente à dosagem de NO encontra-se no Anexo 1.

3.10 Dosagem de Endotelina

Para dosagem de Endotelina, utilizou-se kit e protocolo da R&D Systems (Human Endothelin-1 Immunoassay). Brevemente, placas previamente sensibilizadas foram incubadas

com 100µL de solução contendo sistema de detecção de endotelina. Logo após, adicionaram-se 100 µL das amostras ou diluições seriadas de endotelina 1, por uma hora. Os poços foram lavados com solução de lavagem e incubados com 100 µL de substrato para revelação da peroxidase. Todos os reagentes e soluções foram fornecidos pelo fabricante. Após 30 minutos de revelação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de bloqueio e a densidade óptica avaliada imediatamente em leitor de ELISA (Versamax) , utilizando comprimento de onda de 450 nm. As concentrações dos analitos foram expressas em pg/mL de sobrenadante a partir da análise da curva padrão. A curva padrão referente à dosagem de ET-1 encontra-se no Anexo 1.

3.11 Dosagem de NGF, INF- γ , IL-10, IL-1 β e TNF- α

Para NGF e IL-1 β , utilizou-se kits e protocolos da R & D Systems. Para as outras citocinas, foram usados kits e protocolos da BD Biosciences. Placas de ELISA de 96 poços (Nunc MaxiSorb) foram cobertas com anticorpo de captura, na diluição recomendada para cada kit pelo fabricante, em tampão carbonato (pH9,5) ou fosfato de sódio (pH6,5 ou 7,4) e incubados por uma noite a temperatura ambiente. Após lavagem da placa com PBS contendo 0,05% de Tween 20, foi feito o bloqueio das reações inespecíficas usando-se soluções de bloqueio recomendadas pelo fabricante (PBS com 10% de SFB ou PBS com albumina de soro bovino-BSA a 1%) por 1 hora. Posteriormente ao bloqueio, 100 µL das amostras ou de solução contendo concentrações seriadas dos analitos avaliados foram pipetados em duplicata e incubados por mais 2 horas a temperatura ambiente. Após a lavagem da placa para retirada do excesso das amostras, os poços foram incubados com os respectivos anticorpos de detecção, nas concentrações recomendadas, por mais 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween 0,05% e incubadas com solução de estreptavidina por 30 minutos. As placas foram lavadas novamente com PBS/Tween 0,05% e incubadas com solução reveladora da atividade da peroxidase por mais 30 minutos. A reação foi então bloqueada com adição de 50 µL de solução de bloqueio H₂SO₄ a 2 N e a leitura da absorbância determinada logo em seguida em 450 nm. As concentrações dos analitos foram expressas em pg/mL de sobrenadante a partir da análise da curva padrão. As curvas padrão referentes às dosagens de NGF e de citocinas encontram-se no Anexo 1.

Ressaltamos, neste ponto, que o soro fetal bovino (Invitrogen) foi testado em nosso laboratório quanto à presença de NGF. A dosagem pelo método de ELISA mostrou não haver quantidade detectável dessa neurotrofina no soro adquirido da Invitrogen.

3.12 Análise Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa Prisma 4.0 para Windows e expressos como média \pm desvio padrão. Os dados obtidos mediante dosagem por ELISA e referentes à taxa de infecção e percentual de células infectadas foram analisados pelo test *t* de Student não paramétrico (Kruskal-Wallis), com nível de significância estabelecido igual a $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Morfologia e viabilidade de cardiomiócitos em cultura

No sexto dia de cultivo, os cardiomiócitos mostraram-se aderidos à placa. Cardiomiócitos controles apresentaram forma alongada, com finos prolongamentos e, de modo geral, núcleo arredondado e nucléolo evidente. Na maior extensão da placa, as células estavam confluentes, em arranjo de sincício e com contração espontânea. Os cardiomiócitos exibiram marcação para alfa-actinina, evidenciada pela fluorescência na região de linha Z ao longo das miofibrilas (Fig. 4A). Em nível ultraestrutural, observaram-se miofibrilas características de células musculares estriadas e mitocôndrias no citoplasma dos cardiomiócitos (Fig. 4B e 4C).

Nos cardiomiócitos infectados por 24 horas observou-se menor número de amastigotas intracelulares do que naqueles infectados por 48 horas (Fig. 5A e 5B). No período de 72 horas de infecção, vários cardiomiócitos apresentaram sinais de degeneração, tais como núcleo picnótico e citoplasma fortemente acidófilo (Fig. 5C). Neste período, também foi possível observar células rompidas com liberação de tripomastigotas (Fig. 5D). Tendo em vista a possibilidade dessas células em degeneração, presentes em grande número nas culturas com 72 horas de infecção, alterarem o padrão de secreção dos fatores avaliados, optou-se por apresentar, neste trabalho, apenas os resultados obtidos com 24 e 48 horas de infecção e seus respectivos controles.

Figura 5. Fotomicrografias de cardiomiócitos no sexto dia de cultivo (terceiro dia em meio DMEM-F12 sem soro fetal bovino).

5A: Imunofluorescência para alfa-actinina, marcação com fluoresceína (verde). As setas indicam bandeamento típico de alfa-actinina na região da linha Z;

5B e 5C: Ultraestrutura de cardiomiócitos com arranjo característico de miofibrilas. M: Mitocôndria; MF: Miofibrilas.

Figura 6. Fotomicrografias de cardiomiócitos com 24(6A), 48(6B) e 72(6C) horas de infecção com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Observar aumento do número de parasitas intracelulares, proporcional ao tempo de infecção. Após 72 horas de infecção (6C), são observadas células com núcleos picnóticos e citoplasma fortemente acidófilo (★), além do rompimento de algumas células, com liberação de formas tripomastigotas (detalhe figura 6C). Hematoxilina-Eosina. Barra = 20 µm

4.2 Efeito do tratamento com bosentan e ET-1 sobre a produção de NGF, ET-1, NO e citocinas por cardiomiócitos controles

O sobrenadante coletado no oitavo e nono dias de cultivo de cardiomiócitos controles (grupo 1) apresentou níveis detectáveis de NGF e de endotelina.

Em relação ao NGF, os níveis no oitavo dia ($19,35 \pm 10,72$ pg/mL) foram semelhantes aos do nono dia ($14,09 \pm 1,97$ pg/mL). O tratamento com bosentan por 24 horas (grupo 2) não alterou a produção de NGF pelos cardiomiócitos no oitavo ($7,32 \pm 2,45$ pg/mL) e nono ($15,47 \pm 2,15$ pg/mL) dias de cultivo. Por sua vez, o tratamento com ET-1 (grupo 3) resultou em aumento expressivo da produção de NGF pelos cardiomiócitos no nono dia de cultivo ($47,20 \pm 19,27$ pg/mL) em relação aos cardiomiócitos controles no mesmo período ($14,09 \pm 1,97$ pg/mL). O tratamento duplo (grupo 4) resultou em efeito semelhante ao do tratamento apenas com ET-1 (grupo 3), ou seja, aumento da expressão de NGF no nono dia de cultivo ($60,96 \pm 7,02$ pg/mL) em relação ao seu controle (grupo 1).

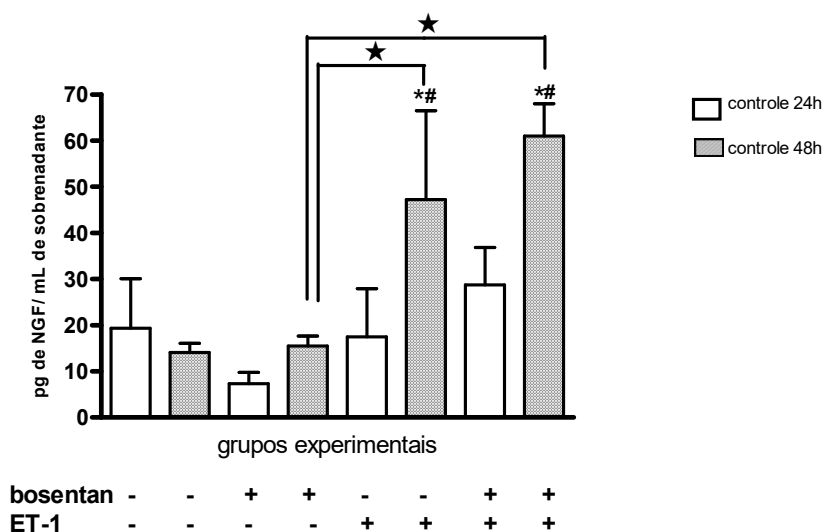


Figura 7. Níveis de NGF (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos controles, cardiomiócitos tratados por 24 horas com 10^{-5} M de bosentan, tratados por 24 horas com 10^{-7} M de ET-1 ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. * $p < 0,05$ (24h X 48h de um mesmo tratamento); # $p < 0,05$ (controle tratado X controle não tratado no mesmo período de tempo); ★ $p < 0,05$ (controle tratado X controle tratado no mesmo período de tempo e com tratamentos diferentes).

A dosagem de ET-1 evidenciou sua produção pelos cardiomiócitos controles no oitavo ($1,98 \pm 0,51$ pg/mL) e nono dia de cultivo ($3,37 \pm 0,49$ pg/mL), sendo maior neste último período. O tratamento com bosentan aumentou os níveis de ET-1 no sobrenadante, tanto no oitavo ($16,22 \pm 5,80$ pg/mL) quanto no nono ($12,90 \pm 3,06$ pg/mL) dias de cultivo. O mesmo

resultado foi obtido após tratamento com ET-1, no oitavo ($7,63 \pm 1,55$ pg/mL) e nono ($8,60 \pm 0,87$ pg/mL) dias de cultivo, embora em níveis menores que os induzidos por bosentan. O tratamento duplo também resultou em maiores níveis de ET-1 nos dois períodos ($20,21 \pm 6,09$ e $22,84 \pm 1,79$ pg/mL) em níveis semelhantes aos induzidos pelo tratamento com bosentan. Neste ponto é importante ressaltar que após cada tratamento, a droga (bosentan e/ou ET-1) foi removida por lavagem das células com o meio de cultivo.

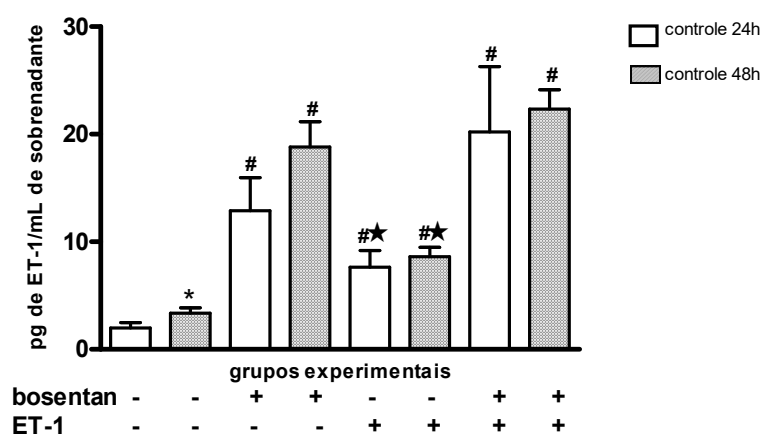


Figura 8. Níveis de ET-1 (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos controles, cardiomiócitos tratados por 24 horas com 10^{-5} M de bosentan, tratados por 24 horas com 10^{-7} M de ET-1 ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. * $p < 0,05$ (24h X 48h de um mesmo tratamento); # $p < 0,05$ (controle tratado X controle não tratado no mesmo período de tempo); ★ $p < 0,05$ (controle tratado X controle tratado no mesmo período de tempo e com tratamentos diferentes).

Em relação às citocinas, não foram detectados níveis de INF- γ , IL-1 β e IL-10 nos grupos controles (grupo 1), tratado com bosentan (grupo 2), tratado com ET-1 (grupo 3) e com ambas as drogas (grupo 4).

TNF- α não foi detectado no sobrenadante de cardiomiócitos controles dos grupos 1, 2 e 3. No entanto, esta citocina foi detectada no sobrenadante das células submetidas a tratamento duplo (grupo 4), tanto no oitavo ($27,53 \pm 23,55$ pg/mL) quanto no nono dia de cultivo ($85,33 \pm 34,20$ pg/mL).

Em todos os grupos e períodos analisados, não se detectou produção de NO pelos cardiomiócitos.

4.3 Efeito do tratamento com bosentan e ET-1 sobre a produção de NGF, ET-1, NO e citocinas por cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi*

4.3.1 Produção de NGF

A infecção de cardiomiócitos com a cepa Y de *T. cruzi* (grupo 5) resultou em aumento da produção de NGF em relação aos controles no período de 24 (19,35± 10,72 versus 59,80 ±15,96 pg/mL) e de 48 horas de infecção (14,09 ±1,97 versus 131,40 ± 40,94 pg/mL). A produção de NGF aumenta no período de 24 a 48 horas de infecção (59,80 ±15,96 versus 131,40 ± 40,94 pg/mL).

O tratamento com bosentan (grupo 6) resulta em aumento acentuado da produção de NGF nas primeiras 24 horas de infecção com a cepa Y (219,30 ± 16,41 versus 59,80 ±15,96). Após 48 horas de infecção, os níveis de NGF no sobrenadante de cardiomiócitos tratados com bosentan e infectados (156,20 ± 52,88) são semelhantes aos dos cardiomiócitos não tratados e infectados (131,40 ± 40,94).

O tratamento com endotelina (grupo 7) também induz maior produção de NGF nas primeiras 24 horas de infecção em relação aos não tratados e infectados (140,8 ±21,53 versus 131,40 ± 40,94), mas em menores níveis que o tratamento com bosentan. Após 48 horas de infecção, os níveis são semelhantes nos grupos tratados (104,70 ± 6,09) e não tratados (131,40 ± 40,94). Já com o tratamento duplo (grupo 8), os níveis de NGF se mantêm elevados nos períodos de 24 (197,30 ±72,79) e 48 horas de infecção (197,9 ± 31,46).

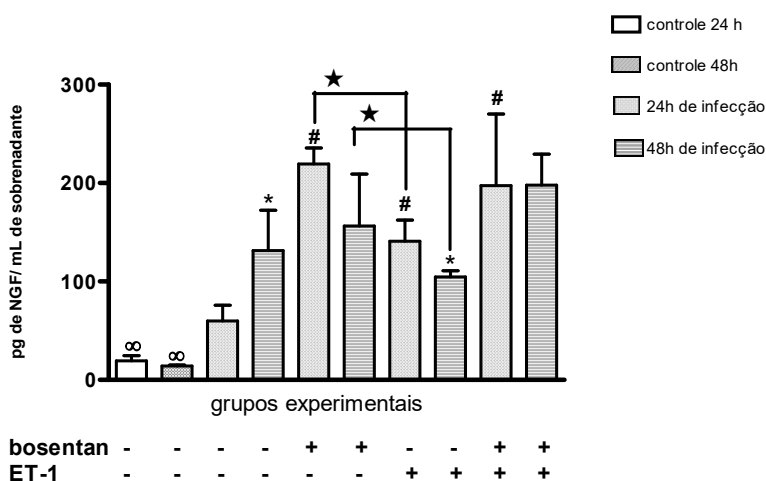


Figura 9. Níveis de NGF (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* e de cardiomiócitos tratados, previamente à infecção, com 10⁻⁵ M de bosentan por 24 horas, ou com 10⁻⁷ M de ET-1 por 24 horas, ou tratados com 10⁻⁵ M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10⁻⁷ M de ET-1 por 24 horas. * p<0,05 (24h X 48h de um mesmo tratamento); ∞ p<0,05 controle não tratado versus infectado não tratado; # p<0,05 (infectado tratado X infectado não tratado no mesmo período de tempo); ★ p<0,05 (infectado tratado X infectado tratado no mesmo período de tempo e com tratamentos diferentes).

4.3.2 Produção de ET-1

A infecção com a cepa Y de *T. cruzi* induziu aumento da produção de ET-1 pelos cardiomiócitos após 24 horas de infecção ($16,22 \pm 5,80$ pg/mL), mas não às 48 horas de infecção ($6,81 \pm 5,16$ pg/mL). O tratamento prévio com bosentan resultou em aumento acentuado dos níveis de ET-1 no sobrenadante de cardiomiócitos infectados por 24 ($50,65 \pm 6,44$ pg/mL) e 48 horas ($63,29 \pm 12,58$ pg/mL) em relação aos cardiomiócitos infectados e não tratados nos mesmos períodos de tempo. O tratamento com ET-1 e o tratamento duplo induziu aumento na produção de ET-1 apenas no período de 48 horas de infecção ($39,51 \pm 9,08$ pg/mL), em relação ao infectado não tratado.

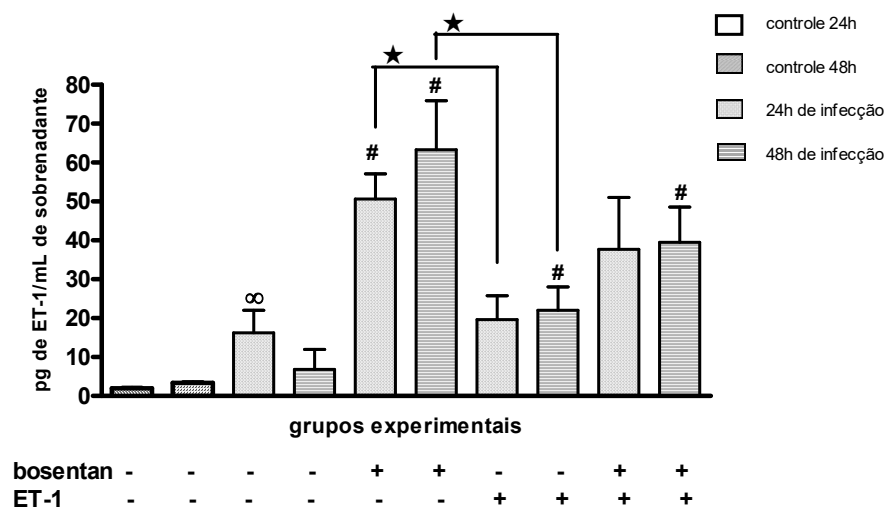


Figura 10. Níveis de ET-1 (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* e de cardiomiócitos tratados, previamente à infecção, com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas, ou com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas, ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. # $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado não tratado no mesmo período de tempo); ★ $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado tratado no mesmo período de tempo e com tratamentos diferentes).

4.3.3 Produção de óxido nítrico

A infecção com cepa Y resulta na detecção de nitrito no sobrenadante tanto às 24 horas ($1,89 \pm 0,24$ p) quanto às 48 horas ($2,35 \pm 0,33$) de infecção.

A infecção com cepa Y após o tratamento com bosentan induziu pequeno aumento do produção de NO com 24 horas ($4,30 \pm 2,04$), seguido de elevação acentuada de sua produção com 48 horas de infecção ($16,09 \pm 8,02$), em relação aos grupos infectados não tratados.

Por sua vez, o tratamento com ET-1 aumenta a produção de NO apenas às 48 horas de infecção ($5,77 \pm 1,40$), mas em níveis menores que aqueles induzidos pelo bosentan.

Já o tratamento com bosentan seguido de tratamento com ET-1 resultou em aumento da produção de NO no período de 48 horas de infecção ($10,09 \pm 6,08$), em níveis inferiores ao tratamento apenas com bosentan.

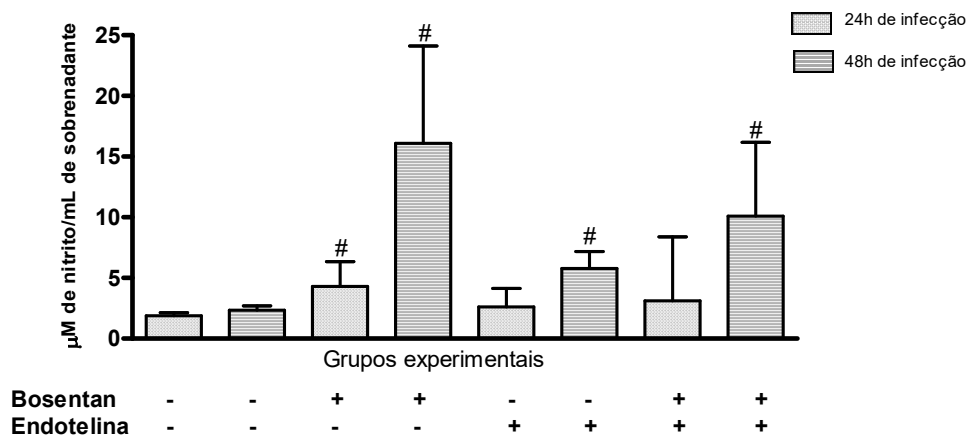


Figura 11. Níveis de NO (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* e de cardiomiócitos tratados, previamente à infecção, com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas, ou com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas, ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. ∞ $p < 0,05$ controle não tratado versus infectado não tratado; # $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado não tratado no mesmo período de tempo).

4.3.4 Produção de citocinas

Dentre as citocinas analisadas, somente IL-10 e TNF- α foram detectadas após a infecção de cardiomiócitos com a cepa Y de *T. cruzi*.

Em relação ao TNF- α , a dosagem no sobrenadante evidenciou sua produção apenas no período de 48 horas de infecção com a cepa Y ($4,93 \pm 4,32$). O tratamento prévio com bosentan ($3,46 \pm 5,57$) ou com ET-1 ($1,80 \pm 1,71$) resultou no mesmo perfil temporal com níveis semelhantes dessa citocina. Já o tratamento duplo com bosentan e ET-1 resultou em aumento na produção dessa citocina nos períodos de 24 ($18,45 \pm 14,49$) e 48 horas ($24,63 \pm 10,80$) de infecção.

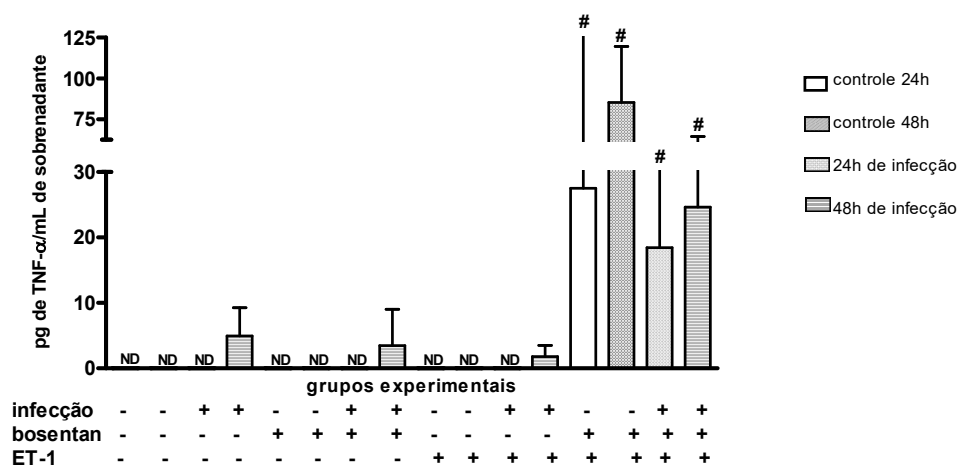


Figura 12. Níveis de TNF- α (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* e de cardiomiócitos tratados, previamente à infecção, por 24 horas com 10^{-5} M de bosentan, tratados por 24 horas com 10^{-7} M de ET-1 ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. # $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado não tratado no mesmo período de tempo).

Níveis de IL-10 foram detectados no sobrenadante em todos os períodos e tratamentos analisados. A infecção com cepa Y induziu a produção de IL-10 em níveis baixo às 24 ($3,12 \pm 4,38$) e 48 horas ($5,72 \pm 6,32$) de infecção. O tratamento prévio com bosentan não alterou a produção de IL-10 em ambos os períodos ($10,06 \pm 8,86$ e $6,99 \pm 8,34$). Já o tratamento prévio com ET-1 resultou em pequeno aumento nos níveis de IL-10 no período de 24 horas de infecção ($21,51 \pm 10,54$), mas não no período de 48 horas ($20,20 \pm 5,51$). O tratamento duplo elevou acentuadamente (cerca de dez vezes) a produção de IL-10 nos períodos de 24 ($94,96 \pm 37,46$) e de 48 ($101,20 \pm 28,29$) horas de infecção.

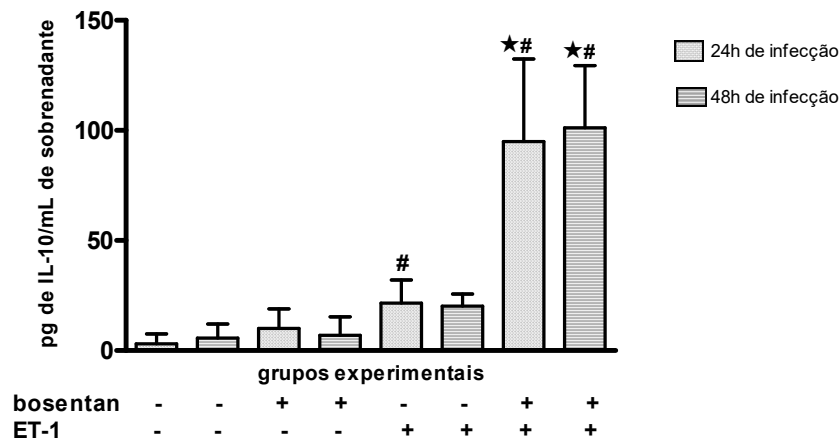


Figura 13. Níveis de IL-10 (pg/mL) em sobrenadante coletado de cultura de cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi*, e de cardiomiócitos tratados, previamente à infecção, por 24 horas com 10^{-5} M de bosentan, tratados por 24 horas com 10^{-7} M de ET-1 ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. # $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado não tratado no mesmo período de tempo); $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado tratado no mesmo período de tempo e com tratamentos diferentes).

4.4 Efeito do tratamento com bosentan e ET-1 sobre a infecção de cardiomiócitos com cepa Y de *T. cruzi*

A taxa de infecção de cardiomiócitos - número de parasitos intracelulares – mostrou-se maior no período de 48 horas ($7,82 \pm 1,05$) que no período de 24 horas ($0,6 \pm 0,03$). O tratamento com bosentan não alterou a taxa de infecção às 24 horas ($0,58 \pm 0,09$) e 48 horas ($7,49 \pm 1,74$). O mesmo resultado foi obtido no tratamento com ET-1 às 24 ($0,50 \pm 0,05$) e 48 ($6,69 \pm 0,7$) horas de infecção. Já o tratamento duplo implicou no aumento do numero de parasitos intracelulares no período de 24 horas de infecção ($1,07 \pm 0,08$), mas não com 48 horas ($7,69 \pm 0,25$), quando comparados com os cardiomiócitos não tratados e infectados.

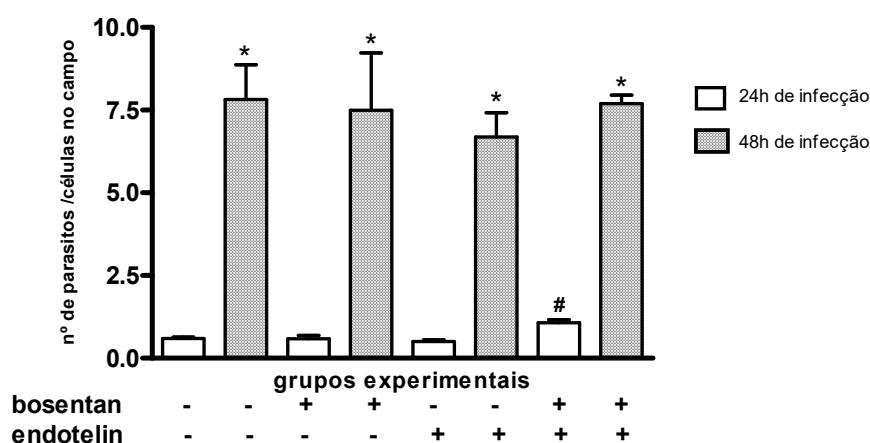


Figura 14. Número de parasitos intracelulares em cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* não tratados e tratados, previamente à infecção, com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas, ou com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas, ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. * $p < 0,05$ (24h X 48h de um mesmo tratamento); # $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado não tratado no mesmo período de tempo).

O percentual de células infectadas mostrou-se maior no período de 48 horas de infecção, em relação ao de 24 horas. Este perfil não foi alterado pelo tratamento com bosentan e com ET-1. O tratamento duplo resultou em aumento no percentual de infecção no período de 24 horas de infecção.

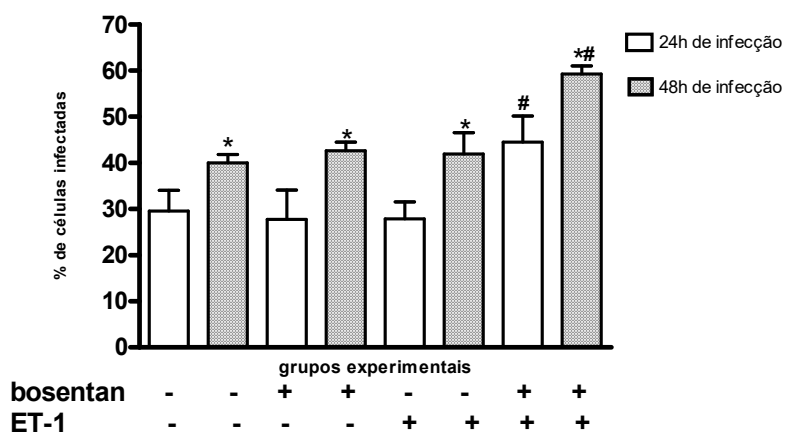


Figura 15. Porcentagem de cardiomiócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* não tratados e tratados, previamente à infecção, com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas, ou com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas, ou tratados com 10^{-5} M de bosentan por 24 horas e a seguir com 10^{-7} M de ET-1 por 24 horas. * $p < 0,05$ (24h X 48h de um mesmo tratamento); # $p < 0,05$ (infectado tratado X infectado não tratado no mesmo período de tempo).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O papel da endotelina no sistema cardiovascular é amplamente discutido na literatura, principalmente no que se refere à sua participação em processos patofisiológicos. A endotelina, proteína que integra a secreção humoral de cardiomiócitos, pode modular a produção de outros fatores por esta célula, tais como ANP (Peptídeo Natriurético Atrial) e citocinas (revisito por Otten & Gadiant, 1995; White *et al.*, 2000; Gianessi *et al.*, 2001).

Em nosso trabalho, observamos que a estimulação de cardiomiócitos, *in vitro*, com ET-1 induz aumento da produção de NGF. Este efeito da endotelina sobre a produção de NGF já foi descrito por outros autores em outros modelos experimentais. Ieda *et al.* (2004) mostraram que camundongos *knockout* para ET-1 apresentam menor densidade de inervação simpática no coração, acompanhada de diminuição dos níveis de noradrenalina e de NGF neste órgão. *In vitro*, os mesmos autores mostraram que: i) o aumento de NGF por cardiomiócitos é controlado pela ET-1, sem participação de outros fatores como a angiotensina II; ii) o bloqueio dos receptores ETA ou de ambos os receptores de endotelina inibe a produção de NGF pelos cardiomiócitos e iii) a produção de NGF é dependente da concentração de ET-1, com maior indução com 10^{-7} M de ET-1.

Observamos também que o tratamento com bosentan aumentou os níveis de ET-1 no sobrenadante de cardiomiócitos controles, tanto no período de 24 quanto 48 horas após o tratamento. De fato, os níveis de ET-1 induzidos por bosentan são duas vezes maiores que os níveis induzidos pela própria endotelina, e semelhantes aos induzidos por tratamento duplo, ou seja, bosentan seguido de ET-1.

O bosentan é amplamente usado em pacientes com hipertensão arterial pulmonar (HAP), devido a seus efeitos benéficos sobre a condição física, a indução de vasodilatação e conseqüente melhora no quadro de HAP (Channick *et al.*, 2001). Cowborn *et al.* (2005) mostraram que o bloqueio seletivo de um dos receptores ETA ou ETB e o bloqueio conjunto de ambos levam a respostas diferentes em pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Segundo este autor, o bloqueio seletivo do receptor ETA nesses pacientes melhora a pressão arterial periférica, a pressão arterial pulmonar, a resistência vascular sistêmica e também o índice cardíaco. O bloqueio dos receptores ETB, no entanto, resulta em um quadro inverso, com aumento da pressão arterial e da pressão arterial pulmonar, aumento da resistência vascular sistêmica e queda do índice cardíaco. Já o bloqueio dual dos receptores de endotelina acarreta quadro muito semelhante ao bloqueio específico do receptor ETA. Os níveis de ET-1 também foram avaliados nesses pacientes e o bloqueio do receptor ETB elevou sua taxa no

sangue quando comparado aos outros dois tratamentos. Outros autores têm mostrado que o bosentan pode aumentar os níveis de ET-1 no plasma (Peled et al., 2006; Hiramoto et al., 2007), tanto em pacientes com HAP como em pacientes que não apresentam este tipo de hipertensão pulmonar.

Fukuroda et al. (1994) demonstraram que o bloqueio seletivo do receptor ETB em ratos diminui o *clearance* da ET-1 quando comparado com os animais não tratados ou tratados com bloqueador seletivo para ETA. Por sua vez, Ozaki et al. (1995) mostraram que, em células epiteliais de veia umbilical humana (HUVEC), os receptores ETB realizam o *clearance* da ET-1 ao serem internalizados por essas células. Em conjunto, esses dados mostram que o receptor ETB, além de ser responsável por vasodilatação mediada por produção de óxido nítrico, é fundamental no *clearance* da ET-1. Seu bloqueio, portanto, pode manter níveis elevados de ET-1, tanto no plasma como em cultivo celular, aumentando sua resposta biológica. *In vitro*, Hasselblatt et al. (1998) também mostraram aumento de ET-1 em cultura de astrócitos após bloqueio dos receptores ETA e ETB. Segundo Peled et al. (2006) tanto o uso de bloqueadores não seletivos de ET-1 quanto o uso de bloqueadores específicos para ETB aumentam a síntese de pré-proendotelina-1, precursor da ET-1, o que não ocorre quando o receptor ETA é bloqueado.

O aumento da produção de ET-1 por cardiomiócitos observado em nosso experimento, após tratamento com bosentan pode resultar do bloqueio do *clearance* de ET-1. No entanto, os níveis observados no sobrenadante às 24 horas (cerca de oito vezes maiores que no controle) e às 48 horas (cerca de quatro vezes maiores que nos controles) nos levam a sugerir a possibilidade de indução de síntese de ET-1 por este bloqueador. Em termos de perspectivas, consideramos importante avaliar os níveis de RNAm para ET-1 nesta condição.

O fato de termos observado níveis maiores de ET-1 no sobrenadante de cardiomiócitos tratados com bosentan em relação aos controles dificulta a interpretação dos resultados obtidos com tratamento duplo – bosentan seguido de ET-1. Este tipo de tratamento resultou em níveis semelhantes aos induzidos pelo bosentan. Avaliamos que esse resultado pode decorrer de dois processos, bloqueio do *clearance* de ET-1 e síntese de ET-1. Experimentos adicionais são necessários para investigar esta questão.

Nosso modelo mostrou que a exposição dos cardiomiócitos tanto à ET-1 quanto ao bosentan não leva à produção de níveis significativos das citocinas analisadas (TNF- α , IL-1 β , INF- γ e IL-10), 24 e 48 horas após o tratamento. Porém, após tratamento duplo, os cardiomiócitos controles produziram níveis detectáveis de TNF- α e IL-10. Especulamos aqui a possibilidade de fenômenos resultantes da ação conjunta de bosentan e endotelina, como

super-expressão de ET-1, redução no “clearance” da mesma e expressão diferencial de subtipos dos receptores para endotelina, estarem associados a este resultado. Yang et al. (2004) verificaram que a super-expressão de ET-1 no coração de camundongos transgênicos é suficiente para causar translocação nuclear de NFκB, expressão de citocinas, inflamação e hipertrofia. Segundo os autores, as ações autócrinas e parácrinas de ET-1 podem ser particularmente importantes na patogênese da insuficiência cardíaca. Diferentes estudos demonstram o efeito estimulador de ET-1 na produção de citocinas. Em culturas de monócitos humanos, ET-1 provoca aumento na concentração de TNF-α, IL-8 e GM-CSF e, em menor quantidade, de IL-1β e IL-6 (Cunningham et al., 1997). Em culturas de mastócitos, Coulombe et al (2002) mostraram que ET-1 inibe a expressão de RNAm para as citocinas do tipo Th2, IL-4, IL-10 e IL-13, mas leva ao aumento da expressão das citocinas do tipo Th1, TNF-α e IL-12. Os autores mostraram, ainda, que TNF-α, por sua vez, é capaz de aumentar a produção de ET-1. Tais dados corroboram nossos achados em relação ao TNF- α, mas difere dos nossos resultados referentes à IL1- β e IL-10. No caso de IL1-β, essa citocina é primariamente produzida por células da linhagem monocítica (Eder, 2009) e, ainda assim, após estímulo por ET-1, os níveis detectados nos sobrenadantes de culturas desse tipo celular foram inferiores ao da maioria das outras citocinas avaliadas (Cunningham et al., 1997). É provável que, ainda que cardiomiócitos produzam IL-1β após estímulo pela ET-1, os níveis dessa citocina podem estar abaixo do limite de detecção pelo método de ELISA, utilizado para dosagem de citocinas em nosso estudo. Quanto a IL-10, não detectamos essa citocina em culturas controles não tratadas ou tratadas somente com bosentan ou com ET-1. Nesses casos, nossos dados encontram suporte na literatura, considerando que estudos descrevem uma ação inibitória da ET-1 na produção de IL-10 (Coulombe et al., 2002). Entretanto, o tratamento duplo provocou aumento significativo de IL-10 no sobrenadante, o que é conflitante com os dados de outros estudos. Interessante notar que IL-10 é considerada uma citocina que se contrapõe aos efeitos deletérios da ET-1, em condições de vasculopatia, existindo inclusive um controle da produção de ET-1 por IL-10 (Giachini et al., 2009; Tinsley et al., 2010), de forma que a produção de IL-10 após o tratamento duplo poderia representar uma resposta dos cardiomiócitos à super-expressão de endotelina.

Com relação à infecção de cardiomiócitos com capa Y de *T. cruzi*, nossos dados mostram que os níveis de endotelina aumentam após 24 horas de infecção, quando comparados ao controle. Wittner et al (1995) mostraram que células HUVEC infectadas por *T. cruzi* produzem ET-1. Já Petkova et al. (2000) mostraram que a infecção com *T. cruzi* eleva os níveis de ET-1 no plasma de camundongos, acompanhado de aumento da pré-

proendotelina, da enzima conversora de endotelina e de ET-1 no tecido cardíaco, além da maior expressão de ET-1 em células endoteliais do coração. Em nossos experimentos, os cardiomiócitos tratados com bosentan previamente à infecção produziram maiores níveis de ET-1 que os apenas infectados. Não há dados na literatura que demonstrem o aumento de síntese de ET-1 após tratamento com bosentan na infecção com *T. cruzi*. O estímulo da produção de ET-1 pela infecção com o *T. cruzi* somado ao bloqueio do “clearance” da endotelina provocado pelo bosentan poderia, em parte, explicar essa super expressão, porém, outras análises devem ser realizadas para investigar essa hipótese.

Com relação ao NGF, a infecção pela cepa Y de *T. cruzi* induz aumento de sua secreção pelos cardiomiócitos, de modo crescente, nos períodos de 24 e 48 horas de infecção. Esses resultados estão em acordo com dados obtidos anteriormente no laboratório Profa Conceição Machado (Pinto, 2006). De modo interessante, observamos que o tratamento com bosentan exacerba a resposta do cardiomiócitos à infecção com cepa Y no que se refere à produção de NGF, induzindo níveis dez vezes maiores dessa neurotrofina no sobrenadante após 24 horas de infecção, em relação aos apenas infectados. Ao contrário, nos cardiomiócitos controles, o tratamento com bosentan não interfere com a secreção de NGF. O tratamento com ET-1, assim como o tratamento duplo induzem maior expressão de NGF, no mesmo período de infecção, mas não nos mesmos níveis induzidos pelo bosentan. Importante lembrar que os níveis de ET-1 nos sobrenadantes de cardiomiócitos infectados e tratados com bosentan estão bastante elevados, com valores três vezes superiores ao controle, o que não acontece nos sobrenadantes de cardiomiócitos infectados e tratados com ET-1, cujos níveis de NGF são semelhantes àqueles detectados nos sobrenadantes de culturas infectadas não tratadas. Como descrito anteriormente, a ET-1 pode modular a produção de NGF, e nesse caso acreditamos que os maiores níveis de ET-1 estimulados pelo tratamento com bosentan se relacionem com os maiores níveis de NGF detectados.

Em nosso trabalho, observamos também que a infecção com cepa Y de *T. cruzi* resulta em detecção de TNF- α e IL-10 no sobrenadante após 48 horas de infecção. Por sua vez, a infecção com cepa Y não induziu níveis detectáveis de IL-1 β e de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas. Os níveis de nitrito no sobrenadante, indetectáveis nos controles, passam a ser detectados após a infecção com cepa Y.

A infecção com *T. cruzi* induz a expressão de diferentes citocinas e quimiocinas no coração, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No coração de camundongos infectados com cepa Y do parasito, foi detectada a expressão de RNAm para TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , além de iNOS, o que não foi observado no coração de animais controles. Por outro lado, em cultura de

cardiomiócitos infectados com a mesma cepa, somente foram detectados RNAm para as citocinas TNF- α e IL-1 β , além de iNOS, sendo que INF- γ não foi detectado nem em cardiomiócitos controles nem naqueles infectados (Machado F et al., 2000). Huang et al (1999) também detectaram aumento de RNAm para iNOS, IL-1 β e TNF- α no coração de camundongos infectados. Em nossos experimentos, não foi detectada a presença de INF- γ , no sobrenadante de culturas controles e infectadas, o que corrobora os dados de Machado F. et al. (2000). Por outro lado, ao contrário de Huang et al (1999) e Machado F et al. (2000), em nossos experimentos não se detectou a presença de IL-1 β , tanto em culturas de cardiomiócitos controles quanto nos cardiomiócitos infectados. Entretanto, consideramos importante ressaltar que em nossos experimentos foi feita dosagem da proteína no sobrenadante. A expressão de RNAm, verificada por aqueles autores pode não refletir, necessariamente, na liberação da proteína para o sobrenadante; e ainda que a tradução ocorra, os níveis de proteínas liberados pelos cardiomiócitos no sobrenadante poderiam estar abaixo do limite de detecção do método por nós utilizado.

Em acordo com Yang et al. (2004), consideramos que a maior produção de ET-1 pode ter levado a maior produção de fatores pró-inflamatórios, o que é comprovado pela maior produção de NO e TNF- α no grupo tratado com bosentan principalmente 48 horas após o tratamento. O tratamento dos cardiomiócitos com endotelina pode ter levado a uma menor produção de ET-1 e com isso níveis de IL-10 puderam ser detectáveis.

O tratamento com bosentan prévio à infecção com cepa Y de *T. cruzi* não alterou a produção de IL-10, em relação aos cardiomiócitos apenas infectados. Já o tratamento com endotelina elevou significativamente os níveis de IL-10 nas primeiras 24 horas com níveis ainda maiores no grupo com duplo tratamento com 24 e 48 horas de infecção. O tratamento com bosentan também exacerba a resposta do cardiomiócito à infecção com cepa Y, quanto à produção de ET-1, NO e TNF- α .

Seguindo o proposto por Yang et al. (2004), a maior produção de ET-1 pode ter levado a uma maior produção de fatores pró-inflamatórios, o que é comprovado pela maior produção de NO e TNF- α no grupo tratado com bosentan principalmente 48 horas após o tratamento. A maior produção de IL-10, aqui novamente, pode ser explicada como uma resposta dos cardiomiócitos aos altos níveis de ET-1, como discutido anteriormente, para culturas não infectadas.

Dados obtidos anteriormente no Laboratório Profa. Conceição Machado (Marques, 2008) mostram que o tratamento com bosentan e ET-1 também alteram o padrão de secreção de macrófagos. No entanto, ao contrário do observado em cardiomiócitos, macrófagos

tratados com bosentan e ET-1 e infectados diminuem a produção de NO quando comparados à macrófagos infectados. Marques (2008) mostrou que macrófagos tratados com ET-1 apresentam um perfil de secreção pró inflamatório. A diferença funcional entre esses dois tipos celulares pode explicar a distinção no padrão de secreção. Além disso, diferenças como densidade de expressão de receptores de endotelinas entre cardiomiócitos (90% ETA e 10% ETB) e macrófagos (predominantemente ETB) também pode alterar o padrão de secreção dessas células nos diferentes tratamentos.

Com relação à infecção, observamos que os tratamentos simples, com bosentan ou endotelina, não alteraram a taxa de infecção nem a proliferação de amastigostas intracelulares. No entanto, o tratamento duplo alterou o número de parasitos intracelulares. Tal achado, mais uma vez, deve relacionar-se aos altos níveis de endotelina, associados a níveis mais elevados das citocinas detectadas nos sobrenadantes das culturas infectadas e com duplo tratamento. É descrito na literatura que tanto a infecção pelo *T. cruzi* quanto a própria endotelina podem alterar o padrão de expressão gênica de cardiomiócitos (Goldenberg et al, 2009; Manque et al, 2011 – referência ET) com conseqüente alteração na resposta à infecção. Além disso, também já foi descrito que diferentes populações de *T. cruzi* podem gerar respostas diferentes (Adesse et al, 2010). Dados do Laboratório Prof^a Conceição Machado mostram que, *in vivo*, o tratamento com bosentan pode aumentar a parasitemia, porém não foi observado aumento de parasitas no miocárdio (Rachid et al, 2006; Marques, 2008). Já macrófagos, apresentaram redução na taxa de infecção, mas não foi observado alteração no número de parasitos por célula, quando tratados com ET-1. Já no tratamento com bosentan, houve aumento tanto da taxa de infecção quanto do parasitismo dos macrófagos. O tratamento duplo, por sua vez, não alterou esses dois parâmetros (Marques, 2008). Especulamos que nossos resultados obtidos com o duplo tratamento reflitam uma resposta dos cardiomiócitos aos elevados níveis de endotelina presentes nessas condições, que poderiam estimular a expressão de moléculas envolvidas na invasão desse tipo celular pelo parasito.

A endotelina, além de exercer papel importante em patologias cardiovasculares parece exercer papel importante durante a infecção de cardiomiócitos pelo *T. cruzi*. As alterações no padrão de secreção dessas células, pós estímulo com bosentan ou ET-1, mostra que a endotelina pode estar envolvida no processo imunopatológico da cardiopatia chagásica. Nossos dados contribuem para o entendimento sobre o papel de endotelina na infecção pelo *T. cruzi* e sugerem novos caminhos a serem pesquisados para melhor compreensão desse processo.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem concluir que:

- i) o estímulo de cardiomiócitos com ET-1 altera o padrão de secreção de NGF e da própria endotelina por essas células;
- ii) o estímulo de cardiomiócitos com bosentan resulta em maior produção de ET-1 por essas células;
- iii) o estímulo de cardiomiócitos com bosentan seguido por estímulo com ET-1 aumenta a secreção de TNF- α por essas células;
- iv) a infecção de cardiomiócitos com cepa Y de *T. cruzi* aumenta a secreção de NGF, ET-1, NO, IL-10 e TNF- α por essas células;
- v) o estímulo de cardiomiócitos com bosentan e/ou ET-1 previamente à infecção exacerba a resposta do cardiomiócitos à infecção com *T. cruzi* no que se refere à secreção de NGF, ET-1, NO, IL-10 e TNF- α ;
- vi) o estímulo de cardiomiócitos com bosentan seguido de ET-1 aumenta o percentual de células infectadas e o número de parasitos intracelulares no período de 24 horas de infecção.

7 REFERENCIAS

ALCANTARA, F.G. Desnervação dos gânglios cardíacos intramurais e cervicotorácicos na molestia de Chagas. *Rev. Goiana Med.* 16: 159-177, 1970.

ALIBERTI JC, CARDOSO MA, MARTINS GA, GAZZINELLI RT, VIEIRA LQ, SILVA JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 64:1961-7. 1996.

ALOE L, ALLEVA E, FIORE M. Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans. *Pharmacol Biochem Behav.* 73:159-66. 2002

ALIBERTI J.C., SOUTO J.T., MARINO A.P.M.P., LANNES-VIEIRA J., TEIXEIRA M., FARBER J., GAZZINELLI R.T., SANTANA J.S. Modulation of chemokines production and inflammatory responses in interferon- γ - and necrosis factor R-1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 158:1433-40. 2001.

ALMEIDA, H.O., BRANDÃO, M.C., REIS, M.A., GOBBI, H., TEIXEIRA, V.P.A. Desnervação e cardiopatia no chagásico crônico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 19: 55. 1986.

ALMEIDA I.C.; CAMARGO, M.M.; PROCÓPIO, D.O.; SILVA, L.S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T.; FERGUSON, M.A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J.* 19: 1476-85. 2000.

ANDRADE, S. J. *Trypanosoma cruzi*: clonal structural of parasite strain and the importance of principal clones. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94:185-7. 1999.

ATIAS, A. Gastrointestinal Chagas disease in Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 24 (1); 70-74. 1969

BENVENUTI LA, ROGGÉRIO A, FREITAS HF, MANSUR AJ, FIORELLI A, HIGUCHI ML. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med Parasitol.* 102: 481-7 2008

BILATE, A. M. B & CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 50:67-74. 2008.

BRODIE C, GOLDREICH N, HAIMAN T, KAZIMIRSKY G. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J Neuroimmunol.* 81:20-30. 1998

BRUNNER F., BRÁS-SILVA C., CERDEIRA A S., LEITE-MOREIRA A. F. Cardiovascular endothelins: essential regulator of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 111: 508-31 2006.

CALLERA G. E., MONTEZANO A.C., TOUYZ R.M., ZORN T.M.T., CARVALHO M.H.C., FORTES Z.B., NIGRO D., SCHIFFRIN E.L. TOSTES C., ETA receptors mediates altered leukocyte-endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-Salt rats. *Hypertension*. 43. 2004

CAMARGOS E.R.S, ROCHA L.L.V., RACHID M.A., ALMEIDA A.P., FERREIRA A.J., TEIXEIRA A.L. Jr., CHIARI E., BARTON M., TEIXEIRA M.M., MACHADO C.R.S. Protective role of ET_A endothelin receptors during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microb. Infect.*, 6: 650-656. 2004.

CAMARGOS E.R.S., FRANCO D.J., GARCIA C.M., DUTRA A.P., TEIXEIRA A.L. Jr, 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*, 62: 604-12. 2000.

CAMARGOS ER, MACHADO CR, TEIXEIRA Jr AL, ROCHA LL, FERREIRA AJ, ALMEIDA AP, BARTON M, TEIXEIRA MM. Role of endothelin during experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Clin Sci (Lond)*.103:64S-67S. 2002

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.*, 39: 456-462. 1988

CHANDRA M.; SHIRANI J., SHTUTIN, V., WEISS, L.M., FACTOR, S.M., PETKOVA, S.B., ROJKIND M., DOMINGUES-ROSALES J.A., JELICKS, L.A., WITTNER, M., TANOWITZ, H.B. J. Cardioprotective effects of verapamil on myocardial structure and function in a murine model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Int. J. Parasitol.*, 32: 207-215. 2002a.

CHANDRA M.; TANOWITZ, H.B.; PETKOVA, S.B.; HUANG, H.; WEISS, L.M.; WITTNER, M.; FACTOR, S.M.; SHTUTIN, V.; JELICKS, L.A.; CHAN, J.; SHIRANI, J. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int. J. Parasitol.*, 32: 897- 905. 2002b.

CHANNICK RN, SIMONNEAU G, SITBON O, ROBBINS IM, FROST A, TAPSON VF, BADESCH DB, ROUX S, RAINISIO M, BODIN F, RUBIN LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 6: 1119-23. 2001.

CHAO CC, SU LJ, SUN NK, JU YT, LIH JC, LIN-CHAO S. Involvement of Gas7 in nerve growth factor-independent and dependent cell processes in PC12 cells. *J Neurosci Res*.74:248-54. 2003

COULOMBE M, BATTISTINI B, STANKOVA J, POULIOT P, BISSONNETTE EY. Endothelins regulate mediator production of rat tissue-cultured mucosal mast cells. Up-regulation of Th1 and inhibition of Th2 cytokines. *J Leukoc Biol*. 71:829-36. 2002.

COURA JR, ANUNZIATO N, WILLCOX HP. Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz.78:363-72. 1983

COURA JR & DIAS JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz.104:1:31-40. 2009

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systemic review. *Acta Trop*. 115: 5-13. 2001

COWBURN PJ, CLELAND JG, MCDONAGH TA, MCARTHUR JD, DARGIE HJ, MORTON JJ. Comparison of selective ET(A) and ET(B) receptor antagonists in patients with chronic heart failure. Eur J Heart Fail. 1: 37-42 2005.

CUNHA-NETO E, DZAU VJ, ALLEN PD, STAMATIOU D, BENVENUTTI L, HIGUCHI ML, KOYAMA NS, SILVA JS, KALIL J, LIEW CC. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol*.167:305-13. 2005.

DE LA MONTE S.M., QUERTERMOUS T., HONG C.C., BLOCH K.D. Regional and maturation-associated expression of endothelin 2 in rat gastrointestinal tract. *Histochem. Cytochem.*,43: 203-209. 1995.

DIAS, J. C. P.; Silveira, A.C.; Schofield, C.J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 603-12. 2002.

DUTRA, W. O. & GOLLOB, K. J.: Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Infectious Diseases*, 21: 287-92. 2008.

FAREH, J.; TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L.; THIBAUT, G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca²⁺ modulation. *Circ Res*. 78:302-11. 1996

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. *Infection and Immunity*. 72: 359–363. 2004.

FUKURODA T, FUJIKAWA T, OZAKI S, ISHIKAWA K, YANO M, NISHIKIBE M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. Biochem Biophys Res Commun. 199:1461-5. 1994.

FRANGOIANNIS, MD; NIKOLAOS G. The immune system and cardiac repair *Pharmacol Res*. 58: 88–111. 2008

GIANESSI, D.; DEL RY, S.; VITALE, R.L. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol. Res*. 43: 111-126. 2001.

GOLDENBERG, R. C. S.; LACOBAS, D. A.; LACOBAS, S. ROCHA, L. L. FORTES, F. S. A.; VAيروس, L. NAGAJYOTHI, F.; CARVALHO, A. C. C.; TANOWITZ, H. B.; SPRAY, D. C. Transcriptomic alterations in Trypanosoma cruzi-infected cardiac. *Microbes Infect.* 11:1140-9. 2009

GOMES J.A.S., BAHIA-OLIVEIRA L.M.G., ROCHA M.O.C., MARTINS-FILHO O.A., GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1 specific response. *Infec. Immun.*, 71: 1185-1193. 2003.

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*, 95:505-9. 2001.

HATTORI A, IWASAKI S, MURASE K, TSUJIMOTO M, SATO M, HAYASHI K, KOHNO M. Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett.* 340:177-80. 1994

HIGUCHI, Mde. L.; BENVENUTI, L.A.; MARTINS REIS, M.; METZGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research.* 60: 96-107. 2003.

HIRAMOTO, Y.; SHIOYAMA, W.; KURODA, T.; MASAKI, M.; SUGIYAMA, S.; OKAMOTO, K. HIROTA, H.; FUJIO, Y.; HORI, M.; YAMAUCHI-TAKIHARA, K. Effect of Bosentan on Plasma Endothelin-1 Concentration in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation Journal.*71:367-9. 2007.

HISS FC, LASCALA TF, MACIEL BC, MARIN-NETO JA, SIMÕES MV. Changes in myocardial perfusion correlate with deterioration of left ventricular systolic function in chronic Chagas' cardiomyopathy. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2:164-72. 2009

HUANG, H.; CHAN J.; WITTNER, M.; JELICKS, L.A.; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; BRAUNSTEIN, V.L.; BACCHI, C.J.; YARLETT, N.; CHANDRA, M.; SHIRANI, J.; TANOWITZ, H.B. 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.

IEDA M, FUKUDA K, HISAKA Y, KIMURA K, KAWAGUCHI H, FUJITA J, SHIMODA K, TAKESHITA E, OKANO H, KURIHARA Y, KURIHARA H, ISHIDA J, FUKAMIZU A, FEDEROFF HJ, OGAWA S. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest*, 113: 876-884. 2004.

JUNQUEIRA LF JR, SOARES JD. Impaired autonomic control of heart interval changes to Valsalva manoeuvre in Chagas' disease without overt manifestation. *Auton Neurosci.* 97:59-67. 2002

KARDAMI E, FANDRICH RR BASIC Fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J Cell Biol.* 109:1865-75. 1989.

KEDZIERSKI, R.M & YANAGISAWA M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41: 851-876. 2001

KEDZIERSKI, R.M & YANAGISAWA M.. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41: 851-876. 2001

KÖBERLE, F.. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis. *Adv Parasitol.*, 68: 63-116. 1968

LEVI-MONTALCINI, R.; SKAPER, S.D.; DAL TOSO, R.; PETRELLI, L. LEON, A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin. *TINS*, 19:514-20. 1996.

LEON JS, ENGMAN DM. Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol.* 31:555-612001

LOVE, T.C. & TUCKER, D.C.. Timing of sympathetic innervation affects growth of myocardium in oculo. *Am. J. Physiol.*, 269: 140-148. 1995

LLAGUNO, M.; PERTILI, L. A. R. R.; SILVA, M. V.; BUNAZAR, P. REGES, A. M.; FALEIROS, A. C. G.; LAGES-SILVA, E.; JUNIOR, V. R.; SILVA, V. J. D.; JUNIOR, V. R. The Relationship between Heart Rate Variability and Serum Cytokines in Chronic Chagasic Patients with Persistent Parasitemia. *PACE.* 34: 724-35. 2011

KIERSZENBAUM F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 37:1-11. 2003

MACHADO F.S., MARTINS G.A., ALIBERTI J.C., MESTRINER F.L., CUNHA F.Q., SILVA J.S. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity, *Circulation*, 102: 3003-3008. 2000.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today.* 14: 119-24. 1998

MACEDO AM, MACHADO CR, OLIVEIRA RP, PENA SD. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99:1-12. 2004

MACHADO, ABM; MACHADO, CRS; GOMES, CB. Depletion of heart norepinephrine in experimental acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi. *Experientia (Basel)* 31: 1202-1203, 1975.

MACHADO, ABM; MACHADO, CRS; GOMEZ, MV. Trypanosoma cruzi: acetylcholine content and cholinergic innervation of the heart in rats. *Experimental Parasitology*, 47: 107-115, 1979.

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

MACHADO, CRS; GOMEZ, MV; MACHADO, ABM. Changes in choline acetyl transferase activity of rat tissues during Chagas' disease. Brz. J. Medical Biological Research 20: 697-702, 1987.

MANQUE, P. A.; PROBST, C. PEREIRA, M. C.; RAMPAZZO, R. C.; OZAKI, L. S.; PAVONI, D. P.; NETO, D. T. S.; CARVALHO, M. R.; XU, P.; SERRANO, M. G. ALVES, J. M. P.; MEIRELLES, M. N. L.; GOLDEMBERG, S.; KRIEGER, M. A.; BUCKI, G. A. Trypanosoma cruzi Infection Induces a Global Host Cell Response in Cardiomyocytes_. Infection and immunity.79:1855-62 2011.

MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.C.; SIMÕES, M.V. Pathogenesis of Chonic Chagas Heart Disease. Circulation, 06: 1109-23. 2007.

MARQUES, CA. Efeito da endotelina sobre células mononucleares em modelos in vivo e in vitro de infecção por Trypanosoma cruzi. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 94 p (dissertação, Mestrado em Biologia Celular). 2008.

MARTINELLI P M.; CAMARGOS E.R.S., MOREL G., TAVARES C.A.P., NAGIB P.R.A., MACHADO C.R.S. Cardiac NGF and GDNF expression during Trypanosoma cruzi infection in rats. Autonomic Neurosci. Bas. Clin, 130: 337-343. 2006.

MARTINELLI P.M., CAMARGOS E.R.S., MOREL G., TAVARES C.A.P., NAGIB P.R.A., MACHADO C.R.S. 2002. Rat heart GDNF: effect of chemical sympathectomy. Histochem Cell Biol 118:337-343

MATSUMOTO H., SUZUKI N., ONDA H., FUGINO M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. Biochem. Biophys. Res. Commun, 164: 74-80. 1989.

MELLO, R.C.N. & MACHADO, C.R.S.. Depletion of radiosensitive leukocytes exacerbates the heart sympathetic denervation and parasitism in experimental Chagas' disease in rats. J. Neuroimmunol., 84: 151-157. 1998.

MELONI M, CAPORALI A, GRAIANI G, LAGRASTA C, KATARE R, VAN LINTHOUT S, SPILLMANN F, CAMPESI I, MADEDDU P, QUAINI F, EMANUELI C. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. 16;106:1275-84. 2010

METZ M, LAMMEL V, GIBBS BF, MAURER M. Inflammatory murine skin response to UB-B light are partially dependent on endothelin mast cells. Am. J. Pathol, 169: 815-822. 2006.

MICERA A, LAMBIASE A, STAMPACHIACCHIERE B, BONINI S, BONINI S, LEVI-SCHAFFER F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. Cytokine Growth Factor Rev. 18. 245-56. 2007

MILES MA, TOYE PJ, OSWALD SC, GODFREY DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 71: 217-25. 1977.

MILEI J, STORINO R, FERNANDEZ ALONSO G, BEIGELMAN R, VANZULLI S, FERRANS VJ. Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. Immunohistochemical and ultrastructural findings. *Cardiology.* 80:424-37. 1992

MINOPRIO, J.L. Chagas' disease. South American trypanosomiasis. *Prensa Med. Argentina* 53: 1972-1976. 1966.

MIYAUCHI T. & MASAKI, T.: Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system, *Annu. Rev. Physiol.*, 61: 391-415. 1999.

MOLINA RB, MATSUBARA BB, HUEB JC, ZANATI SG, MEIRA DA, CASSOLATO JL, PAIVA SA, ZORNOFF LA Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease. *Int J Cardiol.* 113:188-93. 2006.

NAICKER, S. & BHOOLA, K.D.: Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol. Ther.*, 90: 61-88. 2001.

NÓBREGA A.A., GARCIA M.H., TATTO E., OBARA M.T., COSTA E., SOBEL J., ARAUJO W.N. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 15(4); 653-655. 2009.

NUNES MDO C, BELOTI FR, LIMA MM, BARBOSA MM, PINTO FILHO MM, DE BARROS MV, ROCHA MO. Functional capacity and right ventricular function in patients with Chagas heart disease. *Eur J Echocardiogr.* 11:590-5.2010

OZAKI S, OHWAKI K, IHARA M, FUKURODA T, ISHIKAWA K, YANO M. ETB-mediated regulation of extracellular levels of endothelin-1 in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*17:483-9. 1995

PELED M, SHAISH A, FRISHMAN L, COHEN H, TAL R, HARATS D. Endothelin B receptor antagonist increases preproendothelin-1 transcription in bovine aortic endothelial cells and in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 47:668-72. 2006.

PETKOVA SB, TANOWITZ H.B, MAGAZINE H.I., , FACTOR SM, CHAN J., PESTELL RG, BOUZAHZAH B, DOUGLAS SA, SHTUTIN V., MORRIS S.A., TSANG E., WEISS LM, CHRIST G.J., WITTNER M., HUANG H. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol*, 31: 257-263. 2001.

PETKOVA, S.B.; TANOWITZ, H.B.; MAGAZINE, H.I.; FACTOR, S.M.; CHAN, J.; PESTELL, R.G.; BOUZAHZAH, B.; DOUGLAS, S.A.; SHTUTIN, V.; MORRIS, S.A.; TSANG, E.; WEISS, L.M.; CHRIST, G.J.; WITTNER, M. & HUANG, H. Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cardiovasc Phatol.* 9: 257-265. 2000

PETRY, K. & EISEN, H.. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today*, 5: 111-116. 1989

PINTO A.M.T. Infecção invitro com *Trypanosoma cruzi* modificada o padrão de secreção de cardiomiócitos. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, 79 p (dissertação, Mestrado em Biologia Celular). 2006

PISSETTI, C. W.; CORREIA, D.; OLIVEIRA, R. F.; LLAGUNO, M. M.; BALARINS, M. A. S.; SILVA-GRECCOS, R. L.; RODRIGUES JR, V. Genetic and Functional Role of TNF-alpha in the Development *Trypanosoma cruzi* Infection. *Plos Neglected Tropical Disease*, March, Vol 5. 2011.

PRATA A, Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, *Lancet Infect.Dis.* 2001 : 92-100. 2001

RACHID, M.A., CAMARGOS, E.R. S., BARCELLOS, L., MARQUES, C.^a, CHIARI, E., HUANG, H., TANOWITZ, H.B., TEIXEIRA, M.M., MACHADO C. R. S. Blockade of endothelin ETA/ETB receptors favors a role for endothelin during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rat. *Microb. infect.*, 8: 2113-2119. 2006.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L.. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Exp. Immunol.*, 44: 349-354. 1981.

RIBEIRO AL, MORAES RS, RIBEIRO JP, FERLIN EL, TORRES RM, OLIVEIRA E, ROCHA MO. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J.* 141:260-5. 2001

RIBEIRO LC, BARBOSA AA JR, ANDRADE ZA. Pathology of intracardiac nerves in experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:1019-25. 2002

RAE, G.A. & HENRIQUES, M.G.M.O. 1998. Endothelins in inflammation, in: Said, S. M. (Ed.), *Proinflammatory and antiinflammatory peptides*, Marcel Decker, New York. 163-202. 1998

REIS, D.D., JONES, E.M., TOSTES, S JR., LOPES, E.R., GAZZINELLI, G. COLLEY, D.G., McCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 637-644. 1993.

RAMOS SG, ROSSI MA. Microcirculation and Chagas' disease: hypothesis and recent results. *Rev Inst Med Trop.* 41:123-9. 1999

RIPODAS, A. de JUAN, J. A.; ROLDÁN-PALLARES, M.; BERNAL, R.; MOYA, J.; CHAO, M.; LÓPEZ, A.; FERNÁNDEZ-CRUZ, A.; FERNÁNDEZ-DURANGO, R.: Localisation of endothelin-1 mRNA expression and immunoreactivity in the retina and optic nerve from human and porcine eye. Evidence for endothelin-1 expression in astrocyte. *Brain Res*, 912: 137-43. 2001.

ROCHA, C.; RIBEIRO, A.L.P.; TEIXEIRA, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Frontiers in Bioscience*, 8:44-54. 2003.

ROCHA MO, NUNES MC, RIBEIRO AL. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. Mem Inst Oswaldo Cruz.104 :159-66. 2009

RUBANYI, G. M. & POLOKOFF, M.A. Endotelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. Pharmacological reviews. 46: 325-415. 1994

SAKAI, S.; MIYAUCHI, T.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI, I.; GOTO, K.; Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. Nature. 384: 353-5. 1996

SAKURAI-YAMASHITA Y., YAMASHITA, K., YOSHIDA A., OBANA M., TAKADA K., SHIBAGUCHI H., SHIGEMATSU K., NIWA M., TANIYAMA K. Rat peritoneal macrophages express endothelin ET(B) but not endothelin ET(A) receptors. Eur. J.Pharmacol, 338: 199-203, 1997.

SALOMONE, O.A.; CAEIRO, T.F.; MADOERY, R.J.; AMUCHASTEGUI, M.; OMELINAUK, M.; JURI, D.; KASKI, J.C. High plasma immunoreactive endothelin levels in patients with Chagas cardiomyopathy. Am. J. Cardiol., 87: 1217-1220. 2001.

SAMPAIO, A.L.; RAE, G.A.; HENRIQUES, M.G. Effects of endothelin ETA receptor antagonism on granulocyte and lymphocyte accumulation in LPS-induced inflammation. J. Leukoc. Biol, 76: 210-216. 2004.

SCHNEIDER M.P., BOESEN, E.I., POLLOCK D.M. Contrasting actions of endothelin ET_A and ET_B receptors in cardiovascular diseases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 47: 12.1-12.29. 2007.

SCURI M, SAMSELL L, PIEDIMONTE G. The role of neurotrophins in inflammation and allergy. Inflamm Allergy Drug Targets. 9:173-80. 2010.

SILVA J.S., MORRISSEY P.J., GRABSTEIN K.H., MOHLER K.M., ANDERSON D., REED S.G. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. J. Exp. Med, 175: 169-74. 1992.

SILVA J.S., VESPA G.N.R., CARDOSO M.A.G, ALIBERTI J.C.S., CUNHA F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages, Infect. Immun., 63: 4862-4867. 1995.

SILVA, J.S.; MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. Front. Biosci, 8:314-325. 2003.

SILVEIRA, A. C. Os Novos desafios e perspectivas futuras do controle. 2001

SHIMOJO, N.; JESMIN, S.; ZAEDI, S.; SOMA, M.; KOBAYASHI, T.; MAEDA, S.; YAMAGUCHI, I.; GOTO, K.; MIYAUCHI, T.EPA Effect on NOS Gene Expression and on NO Level in Endothelin-1-Induced Hypertrophied Cardiomyocytes. Journal of Experimental Biology and Medicine. 4:913-18. 2005.

SLUCK, J.M., LIN, R.C., KATOLIK, L.I., JENG, A.Y., LEHMANN, J.C. Endothelin converting enzyme-1-, endothelin-1-, and endothelin-3-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroscience*, 91: 1483-1497. 1999.

SOARES M.B.P., SIVA-MOTA K.N., LIMA R.S., BELLISTANI M.C., PONTES-DE-CARVALHO L., RIBEIRO-DOS-SANTOS R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4. Dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol.*, 159: 703-709. 2001.

SOFRONIEW MV, HOWE CL, MOBLEY WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* 24:1217-81. 2001.

TAKEI Y, LASKEY R. Tumor necrosis factor alpha regulates responses to nerve growth factor, promoting neural cell survival but suppressing differentiation of neuroblastoma cells. *Mol Biol Cell.*19:855-64. 2008.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; BARCELOS, L.S.; GOMES, Y.M.;RIBEIRO, A.L.;TEIXEIRA, M.M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.*, 38: 943-50. 2004.

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.

TANOWITZ, H.B. HUANG, H., JELICKS, L.A. CHANDRA, M.. LOREDO, M.L. WEISS, L.M. FACTOR, S.M; SHTUTIN, V. MUKHERJEE, S.. KITSIS, R.N.; CHRIST, G.J. WitTNER, M. SHIRANI, J. KISANUKI, Y.Y. YANAGISAWA, M. Role of endothelin-1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease, *Infect. Immun*, 73: 2496-2503. 2005.

TARLETON RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol.*31:550-4. 2001

TEIXEIRA A.R.L., NASCIMENTO R.J., STURN N.R. Evolution and pathology in Chagas disease. A review. *Mem. Inst. Oswaldo cruz*, 101: 463-491. 2006.

TEIXEIRA, M.L.; REZENDE FILHO, J.; FIGUEIREDO, F.; TEIXEIRA, A.R.L.. Chagas' disease: selective affinity and cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi* immune lymphocytes to ganglion cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J.* 75: 33-45. 1980

VESPA GN, CUNHA FQ, SILVA JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 62:5177-82. 1994

WEIHRAUCH, D.; ZIMMERMANN, R.; ARRAS, M.; SCHAPER, J. Expression of extracellular matrix proteins and the role of fibroblasts and macrophages in repair processes in ischemic porcine myocardium. *Cell Mol. Biol. Res.*, 40: 105-116. 1994.

WHITE, L.R.; JUUL, R.; SKAANES, K.O. & AASLY, J. Cytokine enhancement of endothelin ET_B receptor-mediated contraction in human temporal artery. *Eur J Pharmacol.* 406: 117-122. 2000.

YANG, L.L.; ARAB, S.; LIU, P.; STEWART, D.J.; HUSAIN, M. The role of endothelin-1 in myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: old lessons and new insights. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 83: 47-62. 2005.

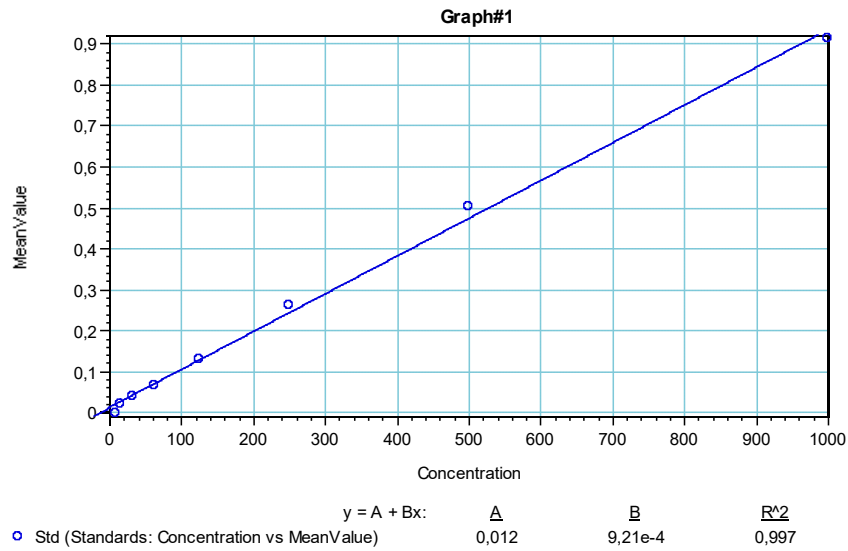
WHO, Fact sheet N° 340, June 2010.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/em/index.html> Acessado em 21 de junho de 2011

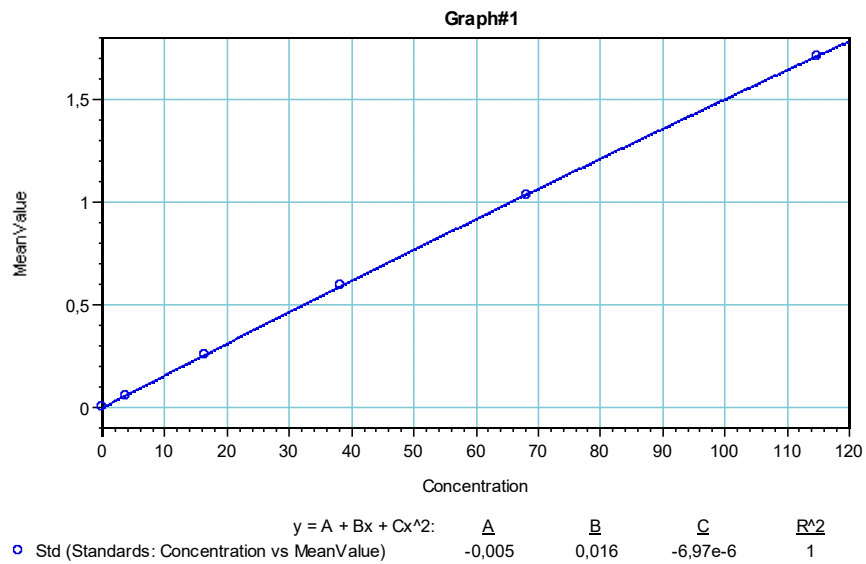
ZHANG L, TARLETON RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.*180: 480-6. 1999

ANEXO

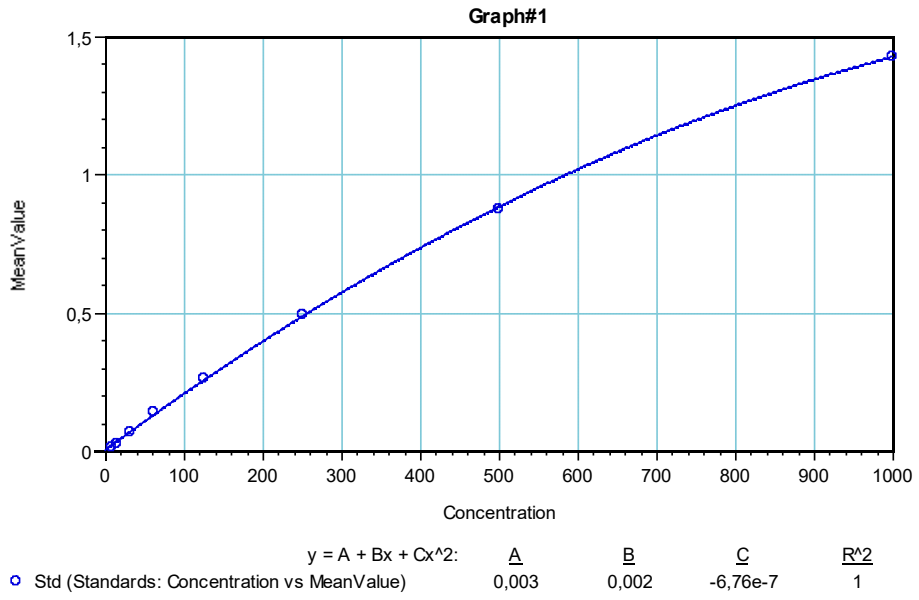
1 Curva padrão de nitrito



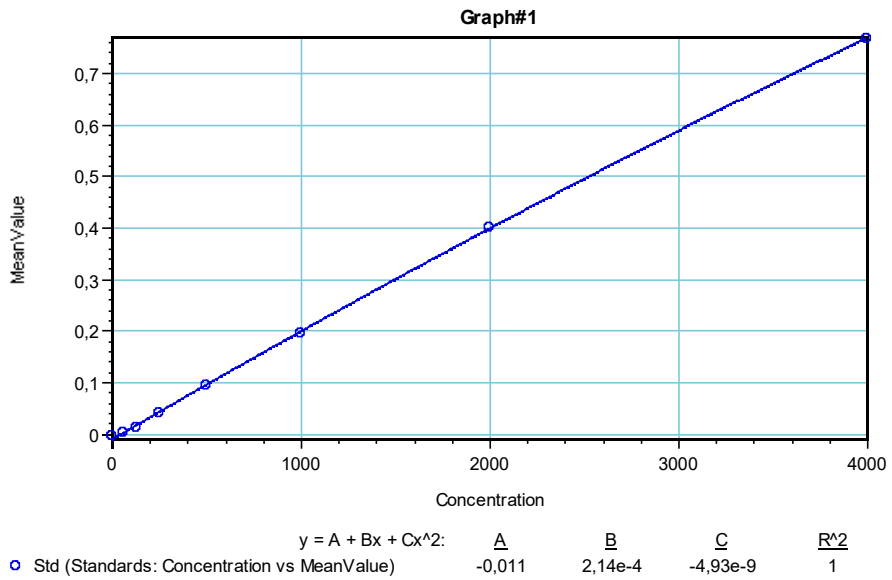
2 Curva padrão de ET-1



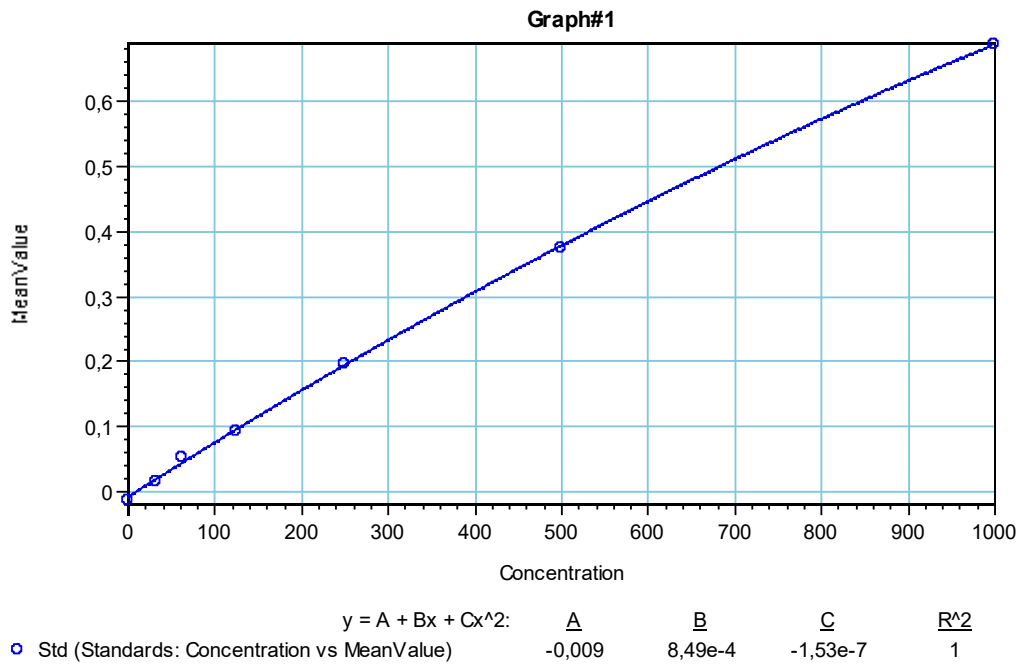
3 Curva padrão de NGF



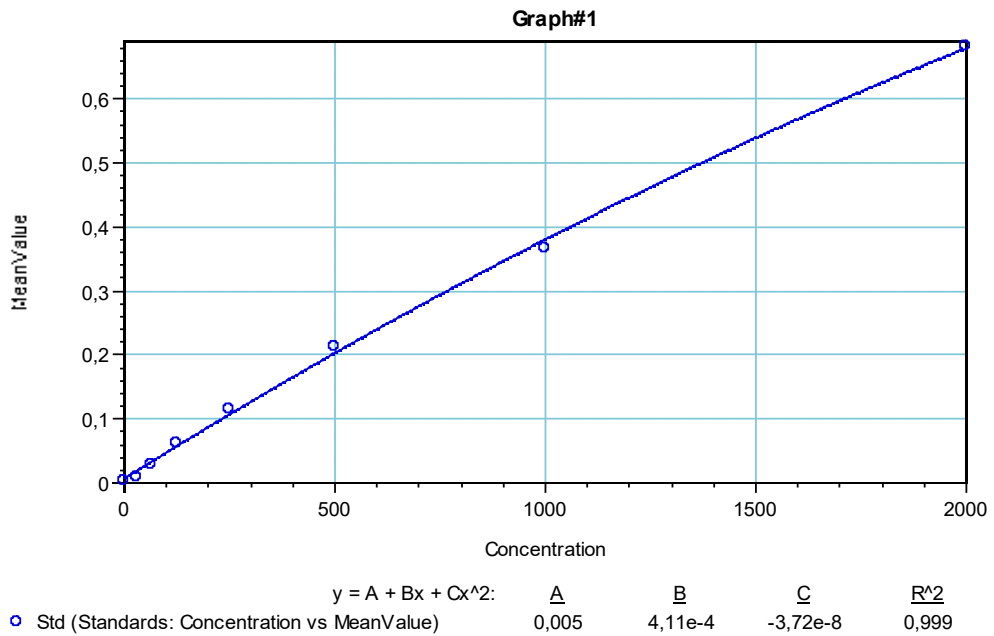
4 Curva padrão de IL-1β



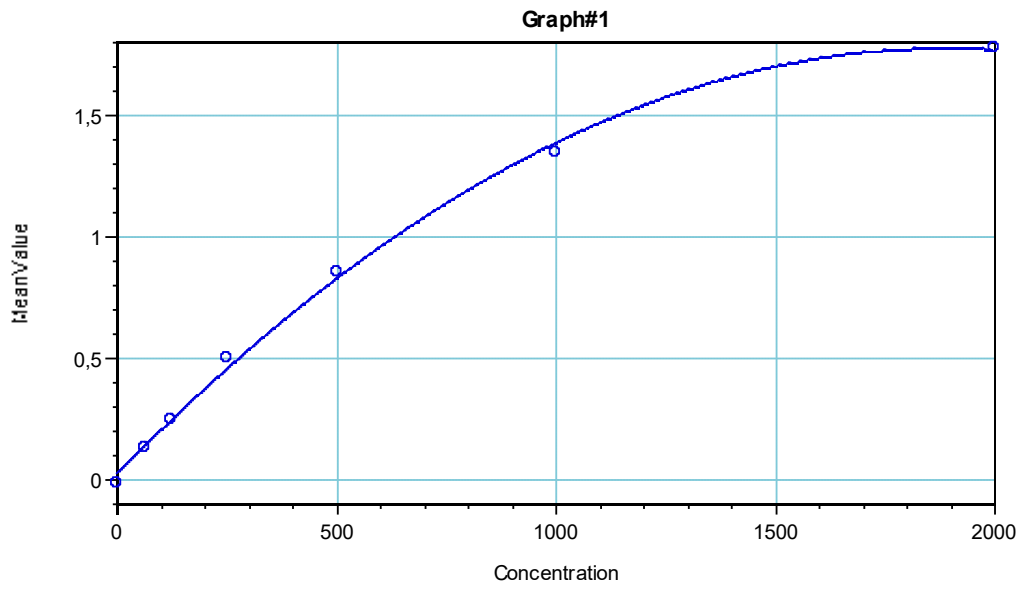
5 – Curva padrão IL-10



6 – Curva padrão INF γ



7 – Curva padrão TNF- α



$y = A + Bx + Cx^2$: A B C R²
 ○ Std (Standards: Concentration vs MeanValue) 0,02 0,002 -4,89e-7 0,998