

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

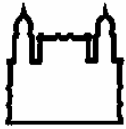
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES E IGF-1, HGF, VEGF, TNF- α
NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BI/6 DURANTE A
INFECÇÃO AGUDA POR *Trypanosoma cruzi*.**

GISELE BATISTA CARVALHO

**Salvador - Bahia – Brasil
2008**



INSTITUTO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

Análise da expressão de IGF-1, HGF, VEGF e TNF- α no coração de camundongos C57Bl/6 infectados com cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.

Gisele Batista Carvalho

Orientadora: Dr^a Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz com objetivo de obtenção do título de mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

Salvador - BA
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C331a Carvalho, Gisele Batista
Análise da expressão dos genes e IGF-1, HGF, VEGF, TNF- α no coração de camundongos c57bl/6 durante a infecção aguda por *Trypanosoma Cruzi*. [manuscrito] / Gisele Batista Carvalho . - 2008.
53 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2008.

Orientadora: Dr^a Milena Botelho Pereira Soares. Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

1. Cardiologia. 2. Miocárdio. 3. Fatores de Crescimento. 4. *Trypanosoma Cruzi* . 5. Infecção. 6. TNF. I.Título.

CDU 616.12:616.937

“ANALISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE IGF-1, HGF, VEGF E TNF-A NO
CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BI/6 DURANTE A INFECÇÃO AGUDA POR
TRYPANOSSOMA CRUZI”

GISELE BATISTA CARVALHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho
Professor Titular
UFRJ

Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ

Dra. Milena Pereira Botelho Soares
Presidente
Pesquisadora-Adjunta
CPqGM- FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À Deus

Por me iluminar nessa jornada, guiando meus passos para que todos os obstáculos fossem superados.

À minha querida família – mãe, irmãs, vó, pai

Pelos cuidados, carinho e incentivo, EU AMO VOÇÊS!!!!!!

Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Pela orientação, dedicação e paciência, contribuindo de forma significativa na minha formação profissional.

Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

Pela oportunidade para realização deste trabalho.

Dra. Cristiane Monteiro

Pela infinita ajuda, paciência e dedicação na elaboração deste trabalho.

Dra. Simone Macambira

Pela atenção e disponibilidade.

Rivair Santana Gomes

Pela cumplicidade, incentivo, amizade, compreensão, principalmente pelo seu amor. Amo você!!!!

À Adriana Lima de Oliveira

Minha querida e sincera amiga, companheira de trabalho, pelo apoio, amizade e força

Aos amigos Fran, André, Henrique, Arlene, Fabi, Fábio, Fernanda, Rômulo, Rick, Jean, Dani, Manuela, Shirley

Pela amizade sincera, conversas, incentivo, momentos de descontração e reclamações da minha ausência (desculpem-me). Voçês são maravilhosos!!

Aos colegas do mestrado

Em especial **Raimundo Coutinho** pelas horas de descontração e amizade.

Aos colegas do LETI, em especial Juliana, Ricardinho, Eunice

Por toda ajuda prestada na execução deste trabalho.

À Lucyvera e em especial Roberta, pelo trabalho de secretária do LETI.

À secretaria do curso de pós-graduação, em especial a **Taise** pela paciência e disponibilidade.

Ao biotério, em especial **Paula, Josi e Márcio.**

CPqGM – FIOCRUZ/BA

Pela estrutura e recursos prestados que possibilita a formação de novos profissionais.

FAPESB/FIOCRUZ

Pela bolsa concedida

RESUMO

Nos últimos anos estudos têm demonstrado a participação de citocinas e fatores de proliferação e diferenciação na regeneração do miocárdio em condições de agressão. Os fatores que influenciam a regeneração do miocárdio na fase aguda da infecção por *T. cruzi* na qual ocorre um processo massivo de destruição do miocárdio, ainda são desconhecidos. Neste trabalho foi investigada a expressão dos genes de HGF, IGF-1, VEGF e TNF- α no coração de camundongos durante o curso da infecção aguda por *T. cruzi*. Fragmentos de corações de camundongos C57Bl/6 infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi*, sacrificados com 15, 25, 30, 40 e 60 dias pós-infecção, foram analisados pela técnica de PCR em tempo real. A expressão dos genes de HGF, IGF-1, VEGF e TNF- α no coração foi avaliada e correlacionada ao grau de inflamação, fibrose e parasitemia nos tempos de infecção analisados. Foi observado um aumento significativo na expressão dos genes de TNF- α e IGF-1 durante toda a fase aguda da infecção, enquanto que a expressão de HGF apresentou-se diminuída. Já a expressão do gene de VEGF não foi significativamente alterada no decorrer da infecção. As expressões dos genes de HGF, IGF-1 e TNF- α apresentaram uma correlação negativa com a parasitemia e a inflamação. Estes resultados indicam que o miocárdio produz vários mediadores solúveis em resposta à infecção por *T. cruzi*, que podem ter uma participação tanto nos mecanismos de lesão, como o TNF- α , como na recuperação da lesão tecidual promovida pela infecção por *T. cruzi*, como é o caso do IGF-1. Outros estudos devem ser realizados no sentido de melhor entender o papel destes mediadores produzidos localmente ou trazidos pela circulação no processo de reparo do miocárdio pela infecção por *T. cruzi*.

Palavras chave: Regeneração cárdica. Fatores de crescimento. Infecção . *T. cruzi*. TNF- α .

ABSTRACT

Studies carried out in the past few years have demonstrated the participation of cytokines and growth factors related to cell proliferation and differentiation in the regeneration of the myocardium after injury. The factors involved in the regeneration of the myocardium during the acute phase of *T. cruzi* infection, when a process of massive destruction of the myocardium occurs, are not known. In this work we investigated the gene expression of HGF, IGF-1, VEGF e TNF- α in the hearts of mice during the acute infection by *T. cruzi*. Heart fragments of C57Bl/6 mice infected by Colombian strain *T. cruzi* were obtained 15, 25 30, 40 e 60 days after infection and analyzed by real time PCR. The gene expression of HGF, IGF-1, VEGF, and TNF- α in the heart was evaluated and correlated to the degree of inflammation, fibrosis and parasitemia at the time points analyzed. A significant increase in TNF- α and IGF-1 gene expression was observed during the acute phase of infection, whereas the expression of HGF was decreased. The expression of VEGF gene was not significantly altered during infection. The expression of HGF, IGF-1, and TNF- α genes showed a negative correlation with parasitemia and inflammation. The results indicate the miocardium as a source of soluble mediators, in response to *T. cruzi* infection, which may participate both in the mechanisms of lesion induction, in the case of TNF- α , as well as in the repair of tissue lesions promoted by *T. cruzi* infection, such as IGF-1. Additional studies should be carried out in order to understand the role of these mediators produced locally or brought by the circulation in the process of lesion repair in the miocardium during *T. cruzi* infection.

Keywords: Regeneration cardiac. Growth factors. Infection *T. cruzi*. TNF- α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de produção de IGF-1 e IGFBPs pelo fígado e outros tecidos , através de estímulos hormonais.	21
Figura 2	Parasitemia dos animais em diferentes dias pós-infecção	36
Figura 3	Secções de tecido cardíaco de animais normais e infectados por <i>T. cruzi</i>	38
Figura 4	Parasitismo no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .	39
Figura 5	Número de células inflamatórias no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .	40
Figura 6	Análise da correlação entre inflamação e parasitemia	41
Figura 7	Porcentagem de fibrose no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .	42
Figura 8	Análise da regulação da expressão gênica de VEGF no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .	43
Figura 9	Análise da regulação da expressão gênica de HGF no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i>	45
Figura 10	Análise de correlação entre inflamação e HGF	46
Figura 11	Análise da regulação da expressão gênica de IGF-1 no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .	48
Figura 12	Análise de correlação entre expressão de IGF-1 e parasitemia	50
Figura 13	Análise da regulação da expressão gênica de TNF- α no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .	51
Figura 14	Análise de correlação entre TNF- α e parasitemia	53
Figura 15	Análise de correlação entre a expressão de TNF- α e de IGF-1	54

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Acido desoxirribonucléico complementar
CPK	Creatina fosfoquinase
GH	Hormônio do crescimento
GHRIH	Hormônio inibidor da liberação do hormônio do crescimento
GHRN	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IGFBP	Proteína ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-IIR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 2
IGF-IR	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
LLCMK2	Células epiteliais do rim de <i>macaca mulata</i>
mM	Milimolar
NRP-1	Neuropilina -1
NRP-2	Neuropilina-2
PAF	Fator ativador de plaquetas
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RNA	Acido ribonucléico
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor para fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 A Doença de Chagas : aspectos epidemiológicos	12
1.2 Infecção por <i>T. cruzi</i>	13
1.3 A fase aguda	14
1.3.1 A cardiopatia chagásica aguda (CCA).....	14
1.4 O Modelo experimental	15
1.5 Fator de crescimento e citocinas	16
1.5.1 Fator de crescimento semelhante a insulina -1	17
1.5.2 Fator de crescimento de hepatócitos	19
1.5.3 Fator de crescimento vascular e endotelial.....	20
1.5.4 Fator de necrose tumoral.....	21
1.6. Fator de crescimento, citocinas e regeneração cardíaca	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. JUSTIFICATIVA	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Animais	26
4.2 Infecção por <i>T. cruzi</i>	26
4.3 Parasitemia	26
4.4 Grupos experimentais	26
4.5 Avaliação histopatológica e análise morfométrica.....	26
4.6 Avaliação do parasitismo	27
4.7 Extração de RNA.....	27
4.8 Obtenção de cDNA.....	28
4.9 Análise da expressão gênica por PRC em tempo real.....	28
4.10 Análises estatísticas.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Infecção aguda de C57B/6 pela cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i>	30
5.2 Avaliação histopatológica do tecido cardíaco durante a infecção aguda por <i>T. cruzi</i>	31
5.3 Expressão gênica dos fatores de crescimento e TNF- α	36
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS	53

1- REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A doença de Chagas: aspectos epidemiológicos

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. É uma zoonose típica das regiões tropicais e subtropicais da América Latina, estendendo-se até a região sudeste dos Estados Unidos da América (DIAS, 2006a). Foi descoberta pelo médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, em 1909, que também descreveu praticamente todos os seus aspectos quando realizava uma campanha contra malária que atingia operários na construção de um trecho da Estrada de Ferro Central do Brasil, ao norte de Minas Gerais. Ao fazer exames em uma menina doente, encontrou tripanosomas em seu sangue e, posteriormente, ao examinar as fezes de insetos existentes na região e o sangue de animais mamíferos, constatou também a presença dos mesmos parasitas. Desta forma, Carlos Chagas pode descrever o agente causador, o transmissor e o modo de transmissão da doença, como também comprovar a existência de vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasita, esclarecendo assim os aspectos básicos da epidemiologia da doença (SILVA *et al.*, 2000).

A doença de Chagas é responsável pela morte de pelo menos 50.000 pessoas a cada ano, devido, principalmente, à insuficiência cardíaca congestiva (DIAS, 2006b). Dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgados após um encontro de especialistas em 2005 indicam a existência de 16-18 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, sendo ainda encontrados indivíduos infectados em países da Europa, na maioria das vezes resultante da migração em busca de melhores condições de vida (LANNES e KROPF, 2007). No Brasil a doença de Chagas é a quarta causa de morte entre as doenças infecto-contagiosas, sendo as faixas etárias acima de 45 anos as mais atingidas (GONÇALVES DE ARAÚJO *et al.*, 2007). Em junho de 2006 o Brasil recebeu uma certificação concedida pela OPS/OMS (Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde) relativa à eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor, o *Triatoma infestans*, e por transfusão de sangue (DIAS, 2006b). Entretanto outras espécies de triatomíneos silvestres se adaptam bem as moradias, atraídos pelas luzes das casas e são importantes vetores de *T. cruzi*.

Recentemente ocorreram surtos com morte por doença de Chagas na forma aguda através da ingestão de formas tripomastigotas dissolvidas em bebidas, como caldo de cana e suco de açaí, em que os insetos vetores, silvestres provavelmente, foram triturados durante o

preparo ou suas fezes contaminaram o alimento, conforme divulgado amplamente na mídia e no Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde 2006. No período de janeiro a setembro de 2007 foi notificado à SVS (serviço de vigilância sanitária) um total de 84 casos com 4 óbitos (letalidade de 4,76%) relacionados a surtos ocorridos na região norte do Brasil, sendo o alimento mais freqüentemente envolvido o açaí (GONÇALVES DE ARAÚJO *et al.*, 2007).

1.2 Infecção por *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário do Filo Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981), Classe Kinetoplastidea (HONIGBERG, 1963), Ordem Trypanosomatida (KENT, 1880) e família Trypanosomatidae.

O ciclo do *T. cruzi* na natureza envolve dois hospedeiros, um inseto triatomíneo, vulgarmente conhecido como barbeiro ou chupão e um mamífero (COURA, 2003).

Quando o triatomíneo, um inseto hematófago, alimenta-se com sangue de um mamífero infectado pelo *T. cruzi*, o mesmo ingere parasitos na forma tripomastigota, que é a forma que circula no sangue. Estes tripomastigotas transformam-se em epimastigotas na porção anterior do intestino do inseto. Diferentemente dos tripomastigotas que são formas infectivas e não replicativas, os epimastigotas são capazes de se multiplicar e não são infectivos. Após vários ciclos de replicação, os epimastigotas migram através do intestino do inseto vetor e, nas porções terminais, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectivas. Durante o repasto de sangue no hospedeiro vertebrado, ocorre a dilatação do abdome do triatomíneo e as formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes e urina do inseto, penetrando no interior do hospedeiro vertebrado através da pele (no local do ferimento provocado pela picada) ou através da mucosa.

Uma vez na circulação, os tripomastigotas metacíclicos interiorizam-se em vários tipos celulares seja através de fagocitose promovida pelos macrófagos, seja através da penetração ativa em células não-fagocíticas, como células musculares. No interior das células do mamífero, os tripomastigotas metacíclicos transformam-se nas formas amastigotas. Estas são as formas que apresentam flagelo diminuto e são capazes de se replicar intracelularmente. Após vários ciclos de replicação, quando a célula do mamífero já esta repleta de amastigotas, ocorre a transformação destas em tripomastigotas que são liberados na corrente sangüínea após a lise celular. Estas formas tripomastigotas são capazes de infectar novas células ou

podem ser ingeridas, através da picada, por triatomíneos durante o repasto de sangue, e o ciclo recomeça (GOLDENBERG e KRIEGER, 1997).

Outros modos de transmissão são as transfusões de sangue, caso o doador seja portador da doença, transmissão congênita da mãe para o filho, manipulação de caça através da ingestão de carne contaminada, acidentalmente em laboratórios (GARCIA e MARTINS, 2005).

1.3 A fase aguda

A doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda que dura cerca de dois meses, seguida de uma fase crônica que se prolonga por toda a vida do hospedeiro. A fase crônica tem sido classicamente dividida em três formas: a indeterminada (assintomática), a cardíaca, mais severa e a digestiva representada pelo megaesôfago e megacólon (TAFURI *et al.*, 2007).

Após a infecção pelo parasita há um período de incubação de 4 a 12 dias, no qual se inicia a fase aguda. Um grande número de parasitas pode ser detectado na circulação sanguínea e no liquor durante a fase aguda (BASQUIERA *et al.*, 2003). Clinicamente, a infecção chagásica se inicia com um conjunto de manifestações, variáveis em frequência e intensidade, formado pelo sinal de porta de entrada da infecção que pode ser inaparente ou aparente, sintomas gerais e alterações sistêmicas. A forma aparente da porta de entrada da infecção pode ser ocular, sinal de Romaña ou cutânea, chagoma de inoculação. Como sintoma geral e de aparecimento precoce destaca-se a febre, acompanhada de mal estar geral, cefaléia, astenia, hiporexia, diarreia, vômito (TANOWITZ *et al.*, 1992; RASSI *et al.*, 2000). Nas alterações sistêmicas, destacam-se o edema subcutâneo, o aumento de volume dos linfonodos, a hepatomegalia e a esplenomegalia, podendo ser observadas ainda, manifestações de comprometimento cardíaco e de meningoencefalite (RASSI *et al.*, 2000). Caracteriza-se como final da fase aguda quando os parasitas circulantes não são mais detectados ao exame parasitológico direto. (SOARES *et al.*, 2001b).

1.3.1 A cardiopatia chagásica aguda (DCA)

A miocardite é o achado mais importante na infecção aguda causada pelo *T. cruzi*, sua patogênese não está totalmente conhecida. As manifestações de comprometimento cardíaco são as de uma miocardite difusa, geralmente acompanhada de pericardite serosa e, às vezes, de certo grau de endocardite (ANDRADE, 2000a).

As formas amastigotas do *T. cruzi* são encontradas em vários tecidos e células, como na camada muscular de vários segmentos do tubo digestivo, no miométrio, nas paredes da veia central da supra-renal, na musculatura estriada em geral, no sistema nervoso central, induzindo nestes sítios o desenvolvimento de uma reação inflamatória focal. No miocárdio, em particular, a resposta usualmente é mais intensa, apresentando caráter difuso e mais intenso. Ao microscópio observa-se um intenso infiltrado mononuclear e edema, dissociando as fibras cardíacas, as quais podem exibir graus diversos de destruição, alterações regressivas, sendo os parasitos facilmente encontrados.

A reação inflamatória exerce papel fundamental na patogenia da doença, desencadeando-se após a lise dos primeiros pseudocistos, a partir provavelmente de antígenos de parasitos em degeneração. Predominam no infiltrado pequenos linfócitos, linfócitos NK, macrófagos e plasmócitos (RASSI *et al.*, 2000, ANDRADE, 2000a). Na cardiopatia chagásica aguda ocorre uma microangiopatia devida a lesões endoteliais, com agregação plaquetária e microtrombose (ROSSI e RAMOS, 1996).

Clinicamente, no coração, a DCA se caracteriza por uma miocardite aguda, com tendência à insuficiência cardíaca, exteriorizando os casos mais graves por descompensação, sinais eletrocardiográficos de sofrimento (taquicardia sinusal, baixa voltagem do complexo QRS nas derivações periféricas, alterações primárias de repolarizações) e cardiomegalia (ao raio x). A evolução dos infiltrados focais ou difusos se faz lentamente, ocorrendo deposição de colágeno em maior ou menor intensidade. O tratamento específico é por quimioterapia antiparasitária, com o objetivo de impedir a evolução clínico-patológica através da eliminação dos parasitos, o que resulta rapidamente na diminuição do processo inflamatório agudo. Não ocorrendo morte na fase aguda, todo o processo inflamatório regride progressivamente, em paralelo com a diminuição da parasitemia (RASSI *et al.*, 2000).

1.4 O modelo experimental

Linhagens de camundongos têm sido utilizadas como modelo experimental de pesquisas biomédicas desde o início do século 20. É o animal experimental de escolha em várias áreas por ser de fácil criação e manipulação, ter uma reprodução rápida (SOARES *et al.*, 2004a), habilidade de se controlar a sua genética (GODARD, 2002).

Nos estudos sobre doença de Chagas, há referências sobre a inoculação em várias espécies animais como cães, cobaias, macacos, coelhos, ratos e camundongos, a fim de investigar diferentes aspectos da infecção pelo *T. cruzi*, com resultados variáveis e características peculiares. De todos os modelos, o camundongo é, sem dúvida, o mais utilizado (ANDRADE *et al.*, 2000b). Além de ser um modelo já bem estabelecido, existe uma vasta gama de reagentes específicos disponíveis no mercado para análise desta espécie.

O estudo sistemático realizado em diferentes linhagens de camundongos infectados pelo *T. cruzi* demonstrou a presença de lesões inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco bem semelhante às aquelas encontradas na doença humana (ANDRADE, 1990). Foi demonstrado, em estudos utilizando o modelo de camundongos, que as diferenças na gravidade da doença dependem da cepa de *T. cruzi* e do “background” genético do hospedeiro (GRAEFE *et al.*, 2003).

Na fase aguda da doença as características da cepa e da linhagem de camundongo utilizadas podem levar a evoluções diferentes. Estas características podem culminar na morte precoce dos animais, quando infectados por cepas do biotopo tipo I, ou permitir uma sobrevivência mais longa, como ocorre com cepas dos biotopos tipo II e III. A cepa Colombiana utilizada nesse estudo é uma cepa do biotopo tipo III, cuja parasitemia evolui lentamente, atingindo níveis elevados entre 20 a 30 dias, com nítido miotropismo determinando miocardite progressiva e miosite nos camundongos (ANDRADE *et al.*, 2000b). A linhagem de camundongo C57Bl/6 é, de uma maneira geral, mais resistente à infecção, quando comparada com outras linhagens como BALB/c e A (PASSOS *et al.*, 2004).

1.5 Fatores de crescimento e citocinas.

Fatores de crescimento são um conjunto de substâncias, de natureza protéica, que, juntamente com os hormônios e os neurotransmissores, desempenham funções na proliferação celular, manutenção da sobrevivência, estímulo da migração, diferenciação e apoptose (THOMSON e LOTZE, 2003).

Essas proteínas, encontradas em concentrações muito baixas, cada uma com um ou mais receptores específicos na membrana plasmática das células-alvo, que são expressos em um ou vários tipos celulares. A estrutura destes e os seus mecanismos de ativação são similar a dos hormônios, com produção de segundos mensageiros, fosforilação de proteínas e alteração da expressão gênica (ALBERTS *et al.*, 2006).

Segundo de Jesus e Campos (2000), os fatores de crescimento são classificados em três categorias:

- Agentes mitogênicos completos – capazes de induzir síntese de DNA e mitose em uma população de hepatócitos em repouso fase G₀;
- Agentes mitogênicos incompletos ou co-mitogênicos – auxiliam a indução da síntese de DNA;
- Agentes inibidores de crescimento - controlam o término da proliferação celular.

Citocinas são pequenas proteínas solúveis envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos e outras que não sejam linfóides. As citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), e fator de transformação do crescimento (TGF β).

As citocinas têm função de regular a duração e intensidade das respostas específicas; recrutar células efetoras para as áreas onde se desenvolvem respostas; e induzir a geração e maturação de novas células a partir de precursores. São produzidas durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade para mediar e regular a resposta inflamatória e imunitária. São moléculas pleiotrópicas, a mesma citocina pode atuar sobre muitos tipos celulares diferentes, redundantes, várias citocinas podem efetuar as mesmas ações, sinérgicas e antagônicas (VILCEK, 2003; JANEWAY *et al.*, 2005)

1.5.1 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1

A existência do IGF-1 foi primeiramente proposta em 1957 com base em estudos indicando que o hormônio de crescimento não estimula diretamente a incorporação de sulfato na cartilagem, porém age através de um fator sérico. Este fator foi inicialmente chamado ‘fator de sulfatação’, posteriormente de ‘somatomedina C’ e, atualmente, de fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (SALMON e DAUGHDAY, 1957). O IGF-1 permite a ação do hormônio de crescimento (GH) por ser um mediador dos seus efeitos.

O GH age diretamente sobre as células do fígado, ligando-se ao seu receptor e induzindo uma série de eventos que acabam resultando na produção do IGF-1 (VERGANI *et al.*, 1997). O hipotálamo interfere na síntese e liberação do GH através de dois neuropeptídeos: o hormônio liberador do GH (GHRN) e o hormônio inibidor da liberação de GH (GHRH ou somatostatina). O GH estimula a síntese do IGF-1, que pode atuar sobre o hipotálamo, estimulando a secreção de somatostatina, inibindo a liberação da síntese de GHRN, e sobre a hipófise, suprimindo a secreção e a expressão gênica do GH (SONNTAG *et al.*, 2005) (Figura 1).

Figura 1

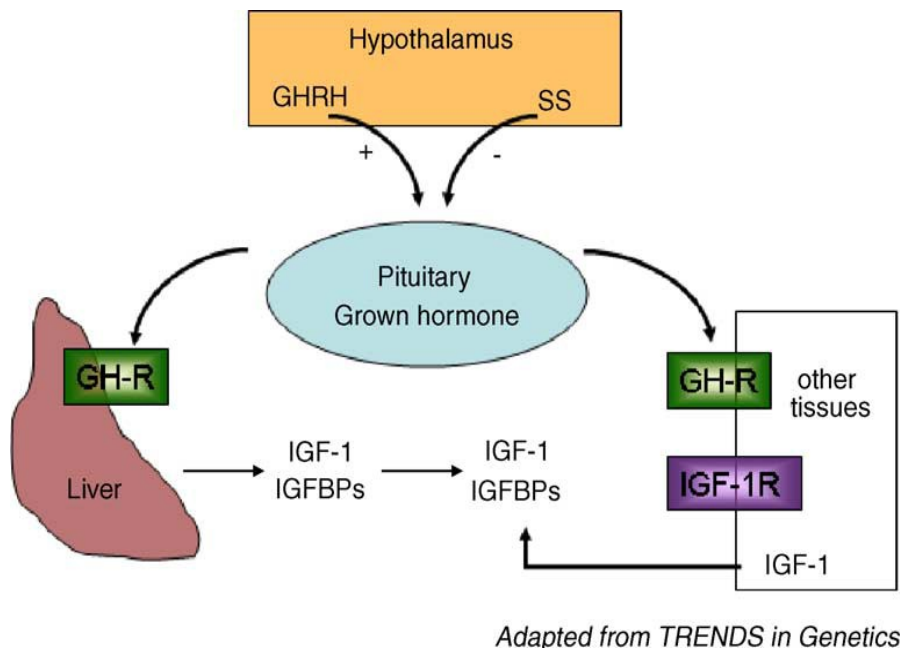


Figura 1: Esquema de produção de IGF-1 e IGFBPs pelo fígado e outros tecidos, através de estímulos hormonais. Fonte: SONNTAG *et al.*, 2005.

O sistema IGF inclui os ligantes IGF-1 e IGF-2, os receptores tipo 1 e 2 de IGF, IGF-IR e IGF-IIR, respectivamente, as proteínas ligantes de IGF, proteínas de ligação aos IGFs (IGFBP) 1 a 6 e as proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF-IR (CASTRO e GUERRA, 2005).

As formas de IGFs 1 e 2 guardam grande homologia estrutural com a molécula de insulina, o que permite aos IGFs, além de exercerem suas ações via receptores específicos tipo 1 e 2, ligarem-se também aos receptores de insulina que apresentem estrutura semelhante ao receptor tipo 1 dos IGFs, ou ainda a receptores híbridos compostos por um hemi-receptor tipo 1 e um hemi-receptor de insulina. A principal função do IGF-IIR é regular negativamente a biodisponibilidade da IGF-2. As ações do IGF-1 são mediadas pelo seu receptor IGF-IR, (JONES e CLEMMONS, 1995).

Na circulação os IGFs são predominantemente unidos às proteínas de ligação IGFBP 1 a 6, que têm a função de enviá-los aos tecidos alvos, prolongar a meia vida e modular a interação com a superfície de membrana dos receptores. A IGFBP3, entre as IGFbps, é a forma mais abundante, responsável pela maior parte da capacidade de ligação às IGFs, em especial à IGF-1, e está normalmente associada a um complexo ternário IGFBP3, IGF-1 e ALS (acid-labile sub-unit). As IGFBP1 e IGFBP6 possuem uma capacidade de ligação 10 vezes maior à IGF-2 em relação à IGF-1 enquanto que as demais IGFbps têm igual afinidade às IGFs (RAJARAM *et al.*, 1997).

Apesar do IGF-1 sérico ser sintetizado em maior quantidade pelo fígado, outros tecidos também o sintetizam e são sensíveis aos seus efeitos (SONNTAG *et al.*, 2005). Tem sido demonstrado um efeito citoprotetor do IGF-1 em diferentes modelos de lesão cardíaca por isquemia, com melhora da função e supressão de apoptose do miocárdio (WANG , 2001; WANG *et al.*, 2003a; BUERKE, 1995).

DAVINI *et al* (2003), utilizando o modelo *ex vivo* murino de lesão causada por isquemia e reperfusão, demonstraram que o IGF-1 tem papel importante na regulação da estrutura e função do miocárdio, conferindo proteção cardíaca com diminuição de edema intersticial, proteção da integridade mitocondrial, diminuição da creatina fosfoquinase (CPK) e melhora da performance cardíaca.

Camundongos transgênicos com expressão aumentada de IGF-1, em modelo de infarto por oclusão de artéria coronariana, apresentaram uma diminuição da morte de miócitos nas regiões adjacentes ao infarto e atenuação da dilatação ventricular quando comparados com camundongos normais (Li *et al.*, 1997).

1.5.2 Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)

O HGF foi inicialmente descrito como mitógeno para hepatócitos. Sua atividade biológica foi primeiramente descrita no soro de ratos normal e parcialmente hepatectomizados (NAKAMURA *et al.*, 1984c). GOHDA *et al.* (1998), também isolaram e purificaram HGF do soro e plaquetas de humanos.

O HGF é uma molécula heterodimérica composta de uma subunidade α de 69 kDa, com estrutura e seqüência semelhante a plasmina e uma subunidade β de 34 kDa, estrutura similar a serina protease, ligada por uma ponte dissulfeto. A biossíntese e a secreção do HGF são feitas como uma forma precursora de cadeia simples inativa (pré-pró HGF, com 728 aminoácidos), que é processada por membros da família serino proteinase na forma de cadeia dupla (MARS *et al.*, 2003).

É também conhecido como “Fator de Dispersão”, por sua capacidade de induzir motilidade de células epiteliais fortemente agregadas, sendo produzido por células mesenquimais de diversos órgãos. (DE JESUS *et al.*, 2000).

O receptor para HGF é o proto-oncogene c-met, que é composto de uma subunidade α de 50 kDa exposta extracelularmente e uma subunidade β de 145 kDa transmembrana contendo um domínio intracelular de tirosina-quinase. A ligação do HGF ao receptor c-met exerce múltiplas ações biológicas envolvendo migração e proliferação celular, morfogênese, efeito anti-apoptótico, hematopoiético, embriogênese e angiogênese (FAN *et al.*, 2000; BUSSOLINO *et al.*, 1992; RICCI *et al.*, 1999; ZANG *et al.*, 2002). Essas atividades se estendem a uma variedade de tecidos, incluindo miócitos cardíaco (NAKAMURA *et al.*, 2000b; NAKAMURA *et al.*, 2005a).

ZHU e colaboradores (2000) demonstraram que o aumento de HGF no soro humano após infarto agudo no miocárdio está associado com a melhora da função cardíaca, sugerindo que o HGF serve como um fator endógeno cardioprotetor. No soro de 1265 pacientes com problemas cardíacos, a elevação de HGF foi associada à redução de casos de infarto fatal no miocárdio (HEESCHEN, 2003).

1.5.3 Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)

Em 1980 DVORAK e FERRARA, utilizando sistemas experimentais “in vivo” e “in vitro”, respectivamente, descobriram que tumores são capazes de produzir um fator de permeabilidade vascular (VPE) e que este fator também é capaz de estimular a proliferação de células endoteliais. Este fator foi identificado e caracterizado, e recebeu o nome de VEGF (GABRILOVICH e DIKOV, 2003).

A família do VEGF inclui 6 membros conhecidos como VEGF ligantes: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (PIGF) (HOEBEN *et al.*, 2004).

O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica básica de 34 a 42 kDa ligada à heparina. O gene do VEGF produz múltiplas espécies de mRNA que determina sete isoformas homodiméricas de VEGF-A com subunidades peptídicas de 121 (120 no camundongo), 145, 148, 165 (164 no camundongo), 183, 189 e 206 aminoácidos. O VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ são os mais encontrados nos mamíferos (HOEBEN *et al.*, 2004; HOMES e ZACHARY, 2005).

O VEGF é um potente peptídeo angiogênico e mitógeno, ativado por diferentes estímulos, tais como citocinas, estresse oxidativo, hipóxia, induzindo angiogenese, degradação da matriz extracelular e formação tubular. Além disso, possui efeito quimiotático sobre leucócitos induzindo uma variedade de mediadores cruciais para inflamação (FERRARA *et al.*, 2003).

Os efeitos biológicos do VEGF são exercidos através da ligação a receptores tirosina-quinases específicos: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4). O VEGF-B e PIGF1 se ligam com alta afinidade ao receptor VEGFR-1. VEGF-C, VEGF-D e VEGF₁₄₅ ligam-se ao receptor VEGFR-2, enquanto as isoformas 121 e 165 reconhecem os dois receptores. Os VEGF-C e VEGF-D também se ligam ao receptor VEGFR-2, porém com menor afinidade quando comparados ao VEGFR-3 que não reconhece o VEGF-A. O VEGF-E se liga especificamente ao VEGFR-3. Neuropilina -1 (NRP-1), Neuropilina -2 (NRP-2) são co-receptores que aumentam a afinidade de ligação para isoformas específicas de VEGF (MORABITO *et al.*, 2006; NEUFELD *et al.*, 1999).

Células endoteliais, miócitos e da linhagem hematopoiéticas como plaquetas, leucócitos, basófilos e neutrófilos podem secretar e apresentar receptores para VEGF. Estudos recentes têm enfatizado o papel deste fator no desenvolvimento de condições fisiológicas e patológicas no organismo, incluindo doenças cardíacas. Camundongos com cardiomiócitos deficientes na expressão de VEGF apresentaram diminuição de quantidade, espessura e

função contrátil de artérias coronarianas (GIORDANO *et al.*, 2001). YANG e colaboradores (2002) reportaram que células-tronco embrionárias que causaram uma melhora da função cardíaca em ratos com infarto no miocárdio apresentavam aumento da expressão de VEGF.

1.5.4 Fator de necrose tumoral

O TNF- α é um polipeptídeo de 17-kDa composto por 157 aminoácidos produzido, principalmente, por monócitos e macrófagos, mas, também, por outros tipos celulares, tais como os miócitos cardíacos, em resposta a determinados estímulos (OPIE, 2004). Dentre os fatores que induzem a produção de TNF- α estão as infecções virais, bacterianas (LPS) e parasitárias, células tumorais, isquemia, transplantes e outras citocinas como interferon gama (IFN- γ), interleucinas 1, 2 e 12 (IL-1, IL-2, IL-12), fatores de crescimento como o fator ativador de plaquetas (PAF) e o próprio TNF- α (MELDRUM, 1998).

O TNF- α age na célula através de dois receptores, TNFR tipo 1 e TNFR tipo 2, sendo o primeiro dominante no coração. Após sua ativação, a interação destes receptores com diferentes vias de sinalização celular levam ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, regulação da sobrevivência, crescimento e apoptose celular. O tipo de resposta induzida pelo TNF- α depende do tipo celular, da ativação celular, do tipo e intensidade do estresse celular e da concentração local da citocina (OPIE, 2004). No coração, por exemplo, o TNF- α compromete a função mecânica e a demanda de oxigênio. Estudo realizado em pacientes com disfunção ventricular esquerda revelou que pacientes com baixos níveis plasmáticos de TNF (<6.5 pg/ml) têm um prognóstico melhor do que pacientes com valores mais elevados (SETA *et al.*, 1996).

O TNF- α é capaz de deprimir a função miocárdica por meio de mecanismos dependentes de óxido nítrico ou esfingomiosina (FINKEL *et al.*, 1992; OHTA *et al.*, 1994), de forma direta e indireta. O mecanismo indireto envolve a indução da enzima óxido nítrico sintetase induzível que leva à produção em excesso de óxido nítrico com consequente efeito inibitório sobre o miocárdio (SAWYER e LOSCALZO, 2002).

O papel do TNF- α na infecção por *T. cruzi* é controverso tanto na fase aguda quanto na crônica. O TNF- α , bem como outras citocinas, e células T CD4+ e CD8+ foram detectadas no infiltrado inflamatório de corações chagásicos (CUNHA-NETO *et al.*, 1998). Na fase aguda foi demonstrado experimentalmente que esta citocina é relevante no controle da parasitemia, na redução da mortalidade (LIMA *et al.*, 1997) e na evolução do processo

inflamatório tecidual através da indução pelo TNF- α de mecanismos anti-oxidativos, mediada pelos receptores TNRF1 (CASTANHOS-VELEZ *et al.*, 1998). MACHADO e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação de citocinas pró-inflamatórias produzidas por cardiomiócitos para controlar o crescimento de parasitas contribui para patogênese da cardiopatia chagásica em camundongos infectados com *T. cruzi*. CHANDRA e colaboradores (2002) comprovaram que o aumento do TNF- α plasmático tem um papel importante no desenvolvimento e progressão do remodelamento ventricular na miocardite aguda causada pela infecção por *T. cruzi*. Concomitantemente, o TNF- α pode induzir efeitos deletérios (caquexia) na fase aguda da doença, sendo este efeito limitado pelos receptores de TNF- α solúveis que neutralizariam a bioatividade desta citocina (TRUYENS *et al.*, 1999).

1.6 Fatores de crescimento, citocinas e regeneração cardíaca.

Até recentemente o coração era considerado um órgão plenamente diferenciado, incapaz de se regenerar após lesões graves. Entretanto, estudos relatam a ocorrência de replicação dos cardiomiócitos humanos e animais sob condições fisiológicas e patológicas (KAJSTURA *et al.*, 1998; BELTRAMI *et al.*, 2001). Estudos utilizando marcadores específicos de células tronco determinaram que células c-Kit⁺ correspondem às células-tronco cardíacas que estão distribuídas pelo coração com morfologia distinta da dos miócitos (ANVERSA e NADAL-GINARD, 2002).

Nos últimos anos a medicina regenerativa tem utilizado células, fatores de crescimento e biomateriais que permitem ao próprio organismo reparar os tecidos e órgãos lesados (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2004). No processo de reparação tecidual, a exemplo de doenças agressoras do miocárdio, diferentes tipos celulares como macrófagos, monócitos, fibroblastos, neutrófilos e células endoteliais relacionados à cicatrização e ao remodelamento tecidual são normalmente recrutados para a região afetada por mecanismos específicos envolvendo citocinas, modificações da matriz extracelular e proteínas de adesão (GOWDAK, 2007).

Citocinas e fatores de crescimento, como já citado anteriormente, produzem efeitos maléficos e benéficos na regeneração do miocárdio em diferentes situações. A infecção aguda por *T. cruzi* é descrita como a doença que mais destrói o miocárdio, porém, ao chegar na fase crônica, há uma recuperação considerável do miocárdio (RASSI *et al.*, 2000).

O papel dos fatores que participam neste processo de regeneração ainda não está bem esclarecido. MARTINELLI e colaboradores (2006) analisaram o aumento da expressão de fatores neurotróficos durante a infecção por *T. cruzi* em ratos, sugerindo a importância desses na regeneração das fibras nervosas destruídas durante a infecção. REIS e colaboradores (2000) pesquisaram os fatores de crescimento presentes no miocárdio em pacientes com a cardiopatia chagásica crônica, concluindo que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) possivelmente exerce um papel fundamental na proliferação de células inflamatórias e, conseqüentemente, na produção de fibrose. Sendo assim, o objetivo deste estudo é investigar a expressão no tecido cardíaco dos fatores de crescimento VEGF, IGF-1 e HGF e da citocina TNF- α , durante os processos de lesão e reparo do miocárdio na infecção aguda por *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a expressão de RNAm para IGF-1, HGF, VEGF e TNF- α através da técnica de PCR em tempo real, utilizando o modelo experimental da infecção aguda por *T. cruzi* em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a parasitemia e o parasitismo dos animais com 15, 25, 30, 40 e 60 dias pós-infecção.
- Avaliar aspectos histopatológicos (inflamação e fibrose) das lesões no tecido cardíaco dos animais em diferentes tempos de infecção.
- Avaliar a expressão de mRNA para os genes de HGF, IGF-1, VEGF e TNF- α nos animais infectados e controles em diferentes tempos de infecção.
- Correlacionar a cinética de expressão dos fatores de crescimentos e citocinas com a parasitemia , inflamação e fibrose no curso da infecção aguda.

3. JUSTIFICATIVA

Até recentemente o coração era considerado um órgão incapaz de regenerar-se após lesões graves. Atualmente vários estudos relatam a ocorrência de replicação dos cardiomiócitos humanos e animais sob condições fisiológicas e patológicas. No processo de reparo tecidual, diferentes tipos celulares como macrófagos, monócitos, fibroblastos, neutrófilos e células endoteliais relacionados à cicatrização e ao remodelamento tecidual são recrutados para a região afetada por mecanismos específicos envolvendo citocinas, fatores de crescimento e regeneração tecidual, modificações da matriz extracelular e de proteínas de adesão.

A fase aguda da infecção por *T. cruzi* é causadora de uma miocardite difusa de grande intensidade. Não ocorrendo morte por insuficiência cardíaca na maioria dos casos, há uma regressão progressiva do processo inflamatório e da parasitemia, iniciando a fase crônica. Estudos recentes demonstraram que uma variedade de fatores de crescimento e citocinas têm apresentado ação benéfica ou maléfica em diversos modelos de lesão cardíaca, sugerindo a importância desses fatores na regeneração ou na destruição do miocárdio.

Recentemente a injeção de fatores de crescimento celular IGF-1 e HGF em corações de ratos lesados por agressão isquêmica, resultou em recuperação da função cardíaca e regeneração celular.

O conhecimento dos fatores que são produzidos durante o reparo cardíaco na infecção por *T. cruzi* abrirá perspectivas para possibilidades de terapias baseadas na simples injeção de fatores de estimulação e/ou crescimento.

Portanto, neste trabalho propomos a análise da expressão de IGF-1, HGF, VEGF e TNF- α no coração de camundongos C57Bl/6 infectados com cepa Colombiana de *T. cruzi* com o objetivo de investigar a expressão mRNA dos mesmos durante a regeneração e/ou destruição do tecido cardíaco neste modelo experimental.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 com 6 a 8 semanas de vida foram usados nos experimentos. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Todos os protocolos usados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animal (CEUA, CPqGM- FIOCRUZ).

4.2 Infecção por *T. cruzi*

Formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (FEDERICI, 1964) foram obtidas de sobrenadantes de cultura de células LLCMK2 infectadas. Camundongos C57Bl/6 foram infectados, por via intraperitoneal, com 1000 parasitas, sendo a concentração ajustada utilizando solução salina como diluente.

4.3 Parasitemia

Os níveis de parasitemia foram avaliados através da contagem, em microscópio óptico, das formas tripomastigotas presentes em 50 campos microscópio em lâmina contendo 5 µl de sangue periférico obtido da cauda do animal e coberta com uma lamínula 22x22 mm, segundo o método descrito por MELO & BRENER (1978).

4.4 Grupos experimentais:

Grupo I - Animais C57 Bl/6 não infectados - 5 animais

Grupo II - Animais infectados sacrificados com 15 dias pós-infecção - 6 animais

Grupo III - Animais infectados sacrificados com 25 dias pós-infecção - 5 animais (para extração RNA, 3 animais).

Grupo IV - Animais infectados sacrificados com 30 dias pós-infecção - 5 animais

Grupo V - Animais infectados sacrificados com 40 dias pós-infecção - 5 animais

Grupo VI - Animais infectados sacrificados com 60 dias pós-infecção - 5 animais (4 para extração RNA).

4.5 Avaliação histopatológica e análise morfométrica:

A análise histopatológica foi realizada nos corações dos animais infectados e normais seguido de fixação com formalina a 10% e inclusão na parafina. Cortes histológicos dos corações com espessura de 4 micra, foram corados com hematoxilina e eosina (1 min hematoxilina e 1

minuto eosina) para avaliação do infiltrado inflamatório, e com picrossírius (corante Sirius red 10 min e corante Light Green por 2 segundos), para observação da fibrose. Para as avaliações morfológicas, as imagens foram digitalizadas usando uma câmera digital colorida (CoolSnap cf), adaptada a um microscópio Olympus AX-70 (Media Cybernetics) e analisadas usando o programa Image pro Plus versão 5.0 (Media cybernetics), permitindo a contagem das células do infiltrado inflamatório. O percentual de fibrose foi determinado usando o mesmo programa, integrando as áreas de tecido fibrótico e não-fibrótico em cada campo, em cortes de coração corados por picrossírius vermelho.

Foram analisados 100 campos em 5 seções do coração para contagem de células inflamatórias, com aumento de 200X, de forma cega e aleatória (átrio e ventrículo) e 10 seções por coração aumento de 600X, de forma cega e aleatória (átrio e ventrículo) para quantificação fibrose.

4.6 Avaliação do parasitismo

Para análise do parasitismo, cortes histológicos dos corações com espessura de 4 micra, foram corados com hematoxilina e eosina (1 minuto hematoxilina e 1 minuto eosina). Os ninhos de amastigotas foram contados em 3 seções do coração por animal nos diferentes dias de infecção.

4.7 Extração de RNA

Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados por deslocamento cervical e 50% do coração foi submetido a congelamento rápido no nitrogênio líquido e conservados a -70° C. O RNA foi extraído do tecido cardíaco utilizando o kit QUIAGEN RNeasy Minikit (Quiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Fragmentos de aproximadamente 30 miligramas de coração foram macerados em graus estéreis com nitrogênio líquido até virar pó. Após maceração foi adicionado tampão de lise contendo beta-mercaptoetanol (Sigma). O material genético foi precipitado em etanol 70% e transferido para uma mini-coluna de extração da QUIAGEN. O RNA foi eluído em água *Rnase-free* e a quantificação e o grau de pureza do RNA foram determinados por espectrofotometria utilizando o instrumento Nanodrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, EUA).

4.8 Obtenção de cDNA

Inicialmente, foi feita a digestão do DNA contaminante presente na amostra de RNA eluído, adicionando a enzima Dnase I, Amp Grade (Invitrogen). A inativação da enzima foi feita pela administração de EDTA 25 mM (Invitrogen) por 10 minutos a 65° C no *Thermomix* (Eppendorf, Germany). A reação de transcrição reversa foi feita adicionando oligo dT (Invitrogen), dNTP 10 mM (Invitrogen), seguido de DTT 0,1 M (Invitrogen) e da enzima SuperScript II (Invitrogen); incubados por 1 hora a 42° C e por 15 minutos a 70° C.

4.9 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Aproximadamente um micrograma de cDNA foi utilizado para a amplificação a partir da reação de PCR em tempo real para os genes VEGF, IGF-1, HGF e TNF- α . Todas as reações foram realizadas no termociclador 7500 Real Time (Applied Biosystems, Foster city, CA).

O número de cópias dos genes foram determinadas utilizando TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied biosystems) para os genes GAPDH, VEGF, IGF-1 e TNF- α e SYBR® Green ER™ qPCR SuperMix (Invitrogen™, USA) para o gene HGF e beta-actina.

O protocolo de amplificação de reação com Taqman realizou-se com 55 ciclos (1 ciclo de 50°C por 2 min; 1 ciclo de 95°C por 10 min; 55 ciclos a 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 30 seg; 1 ciclo de 72° C por 10 min) e com 1 ciclo de 95° C por 10 min; (40 ciclos de 95° C por 15 seg e 1 ciclo de 60° C por 1 min), 1 ciclo com curva de dissociação a 95° C por 10 seg; 60° C por 20 seg; 95° C por 15 seg para Sybergreen . A curva de dissociação foi realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência da formação de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico.

As seqüências de primers utilizadas neste estudo estão listados na tabela abaixo:

Tabela 1: Sequência primer

GENES	SEQUENCIA DO PRIMER	METODOS
HGF	5' CAAGGTCTGGACTTACATGTTCCA 3' (senso) 5' GCTAGCATCTGGCTCCAGAA 3' (antisenso)	Sybergreen
Beta-actina	5' AGGCATCCTCACCTGAAGTA 3' (senso) 5' CACACGCAGCTCATTGTAGA 3' (antisenso)	Sybergreen
IGF-1	ID:Mm00445259 ml, não fornecida pela Applied Biosystem	Taqman
VEGFa	ID: MM00437304 ml, não fornecida pela Applied Biosystem	Taqman
TNF-α	ID: Mm00443258 ml, não fornecida pela Applied Biosystem	<u>Taqman</u>
GAPDH	ID: Mm99999915 gl, não fornecida pela Applied Biosystem.	Taqman

Os cálculos dos níveis de mRNA foram obtidas através da diferença entre (Ct do gene endógeno animal não infectado - Ct do gene de interesse animal não infectado) – (Ct do gene endógeno animal infectado – Ct do gene de interesse do animal infectada), pelo método de normalização $\Delta\Delta Ct$, segundo Yuan e colaboradores (2006).

O Ct (*Threshold cycle*) e o primeiro ciclo de amplificação, no qual o amplicon de DNA e detectado acima da linha basal.

Foi considerado aumento da expressão animais com número de mRNA 2 vezes maior que o controle e diminuição da expressão animais com número de mRNA menor que a metade da expressão do controle.

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc.) baseadas na análise de variância (ANOVA), pós-teste Newman-Keuls, para análise do parasitismo tecidual, número de células inflamatórias e % fibrose e Kruskal-Wallis test, pós-teste Dunns para análise da expressão mRNA, além do teste do qui-quadrado com correção de Yates e do teste de Pearson. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Infecção aguda de camundongos C57Bl/6 pela cepa Colombiana de *T. cruzi*

Foi avaliado o perfil parasitêmico dos animais durante a infecção, representado na figura 2. A parasitemia foi progressiva, com pico em torno do 30º dia de infecção. Após esse período os animais apresentaram uma queda contínua da parasitemia no sangue, tendendo a se tornar negativa no 60º dia.

Figura 2

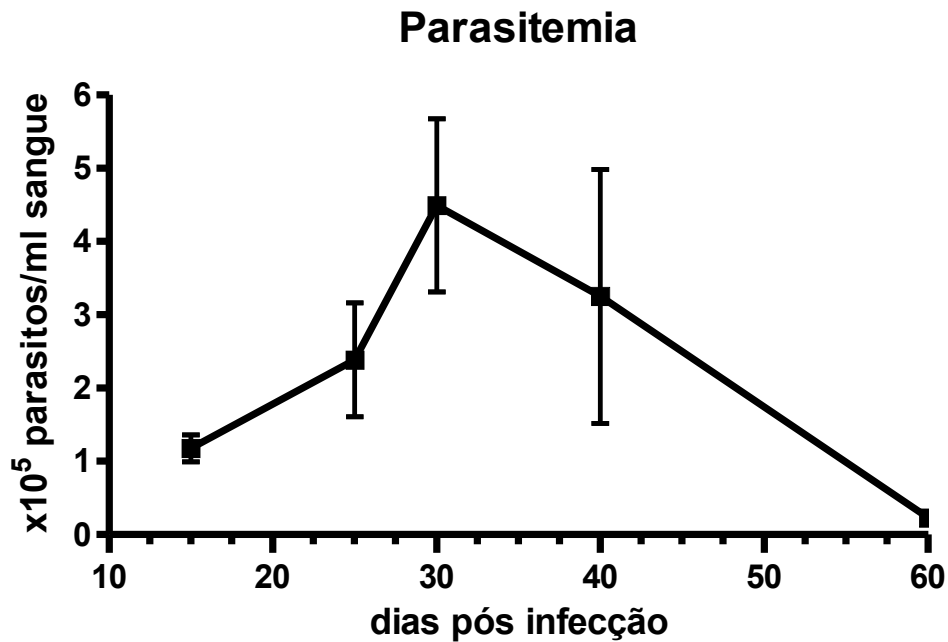


Figura 2: Parasitemia dos animais em diferentes dias pós-infecção. Animais da linhagem C57Bl/6 foram infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A contagem das formas tripomastigotas no sangue foi realizada em diferentes dias pós-infecção. Dados representam a media com desvio padrão da parasitemia de 4 a 26 animais por ponto.

5.2 Avaliação histopatológica do tecido cardíaco durante a infecção aguda por *T. cruzi*

A análise histopatológica dos corações de camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* demonstrou uma miocardite difusa (Figura 3), com infiltrado inflamatório multifocal composto predominantemente de células mononucleares, podendo ser vistos alguns polimorfonucleares e raros eosinófilos. Não há diferenças significativas no padrão de células inflamatórias que compõem o infiltrado inflamatório durante o período avaliado. Fibras cardíacas apresentando ninhos de formas amastigotas intracelulares predominando no 15º dia de infecção (Figura 3B). Áreas com intenso infiltrado inflamatório de células linfocitárias e macrofágicas associado à destruição de fibras musculares, encontradas com maior intensidade no 30º dia de infecção (Fig. 3C e D).

No final da infecção, foi observada a diminuição do número de células inflamatórias, a ausência de ninhos e uma menor quantidade de fibras em degeneração (Fig E), concomitante ao aumento de fibrose.

Figura 3

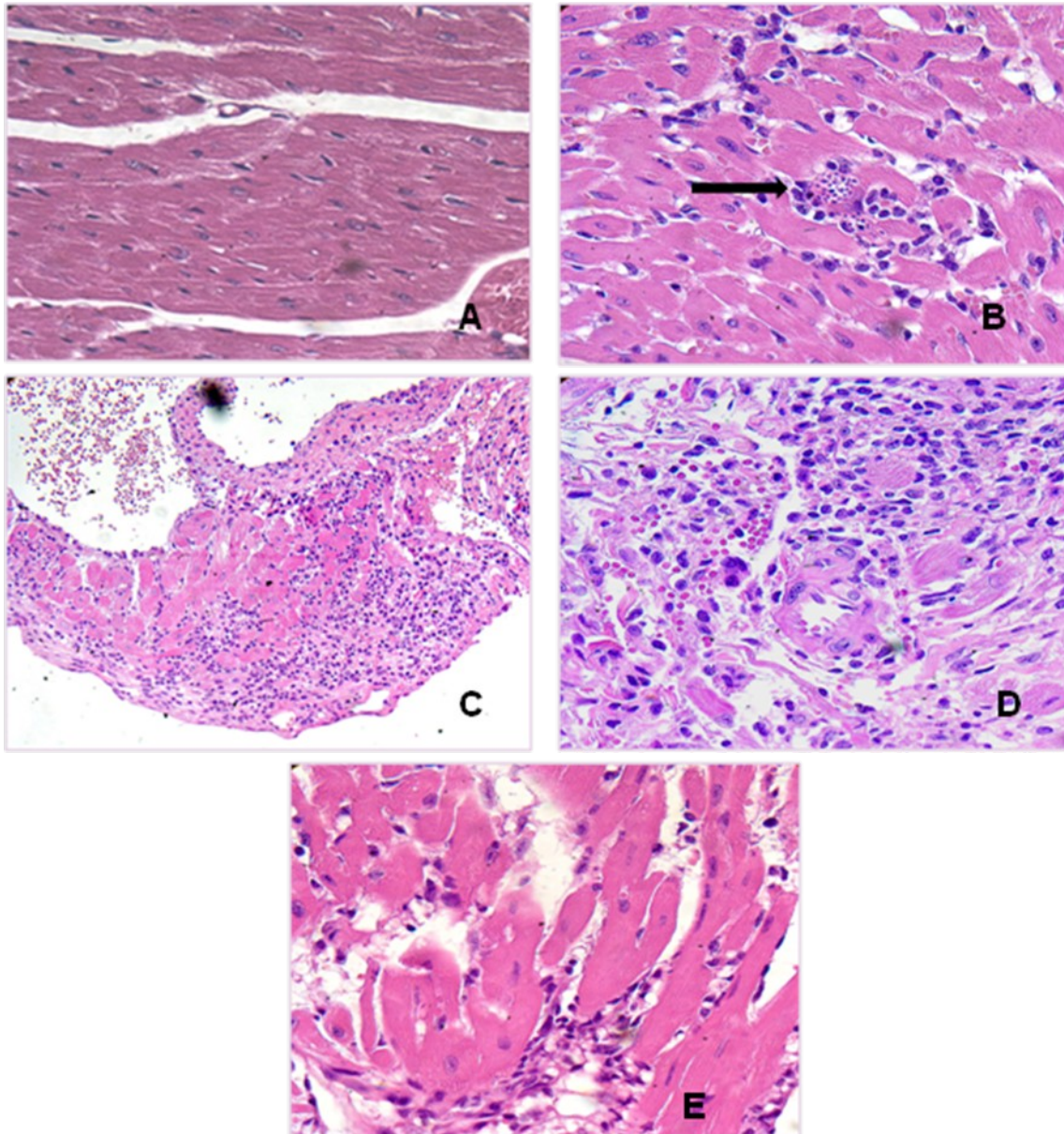


Figura 3: Secções de tecido cardíaco de animais normais e infectados por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes dias de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* para análise histológica do coração. **A**, Coração de camundongo C57Bl/6 não-infectado. **B**, Ninho com formas amastigotas (15 dias pós-infecção). **C**, Secção átrio com intenso infiltrado inflamatório e destruição de fibras (30 dias pós-infecção). **D**, Intenso infiltrado inflamatório associado destruição fibras (30 dias pós-infecção). **E**, Diminuição infiltrado inflamatório (60 dias pós-infecção). H&E, aumento de 600X, figura C, aumento de 200x .

O parasitismo tecidual no tecido cardíaco foi avaliado durante a fase aguda da infecção (Figura 4). A contagem de ninhos de parasitas em secções de coração dos animais nos diferentes dias pós-infecção demonstrou um elevado número de ninhos no 15º dia de infecção, que diminui no decorrer da infecção, indicando que o pico de parasitismo tecidual precede aquele da parasitemia (por volta do 30º dia).

Figura 4

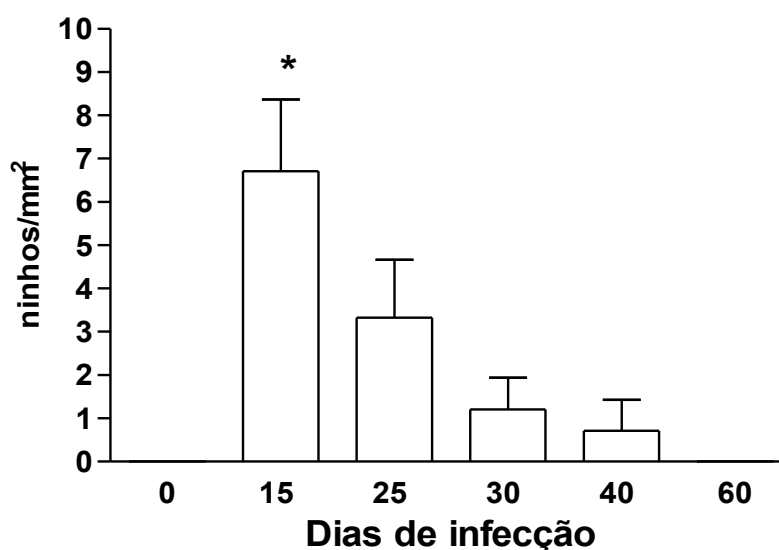


Figura 4: Parasitismo no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes períodos de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. O número de ninhos de parasitas foi avaliado e integrado por área, em secções de corações coradas por H&E. Os dados representam a média±SEM de 6-5 animais por grupo. * $p < 0.01$.

A quantificação das células inflamatórias no tecido cardíaco, feita através de análise morfológica em secções coradas por hematoxilina e eosina, demonstra a presença de células inflamatórias no miocárdio de animais com 15 dias de infecção em diante (Figura 5). O número de células inflamatórias tende a decrescer após o pico de parasitemia (30º dia), sendo significativamente menor no 60º dia de infecção ($p < 0,05$ em relação ao 25º e 30º dia).

Figura 5

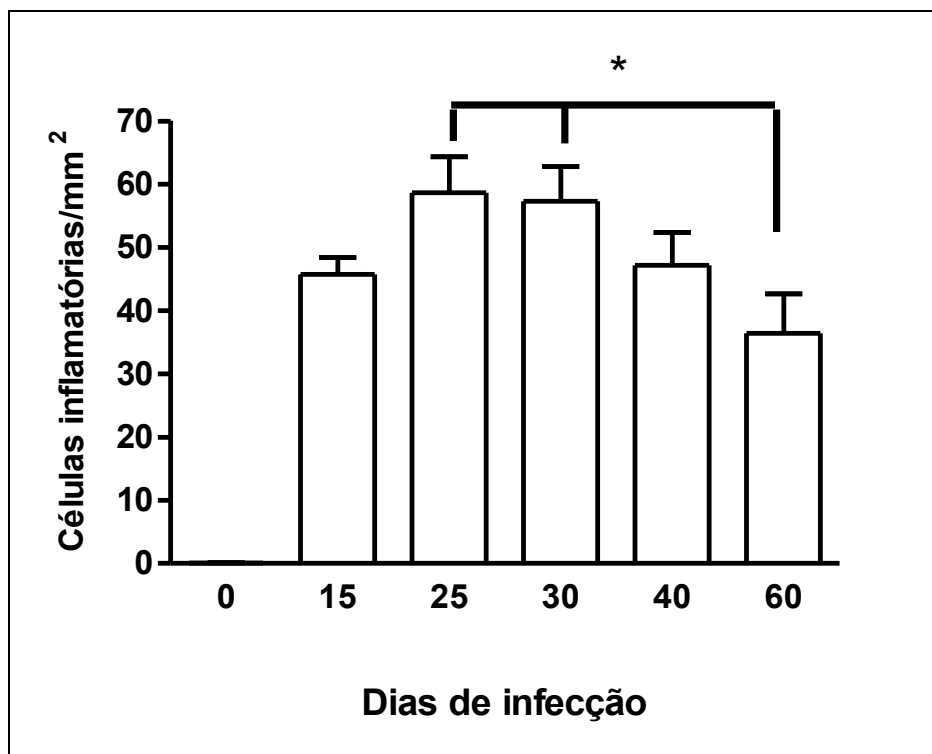


Figura. 5: Número de células inflamatórias no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes períodos de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. O número de células inflamatórias foi avaliado por morfometria em secções de corações coradas por H&E. Os dados representam a média±SEM de 5-6 animais por grupo. * $p < 0.05$.

Foi observada uma correlação positiva entre inflamação e parasitemia, ou seja, o aumento de parasitemia induz um aumento da inflamação no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção (Figura 6).

Figura 6

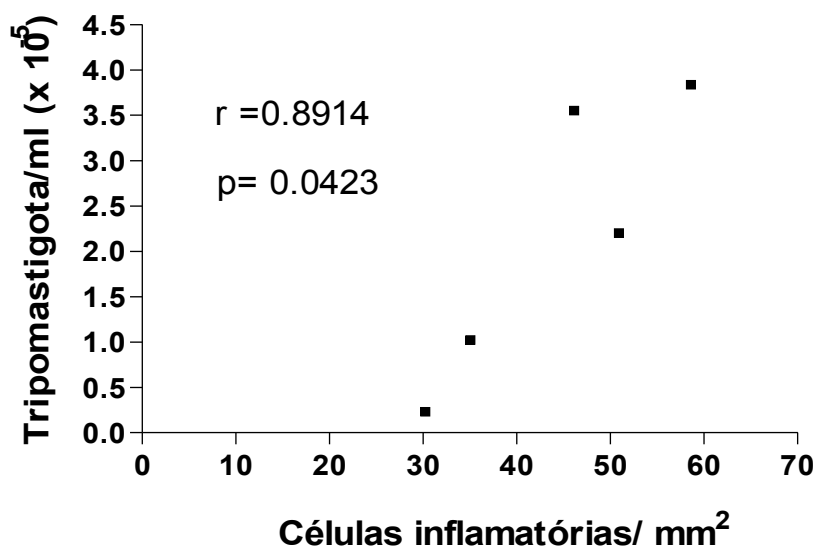


Figura 6: Análise da correlação entre inflamação e parasitemia. A análise de correlação entre a inflamação e a parasitemia foi feita utilizando as médias dos grupos de animais (5 a 6 animais por grupo) em diferentes dias de infecção.

A quantificação da fibrose realizada por morfometria, em secções de coração coradas com picrossírius vermelho, demonstra um aumento crescente com o tempo de infecção, atingindo uma porcentagem mais alta no 60º dia de infecção (Figura 7).

Figura 7

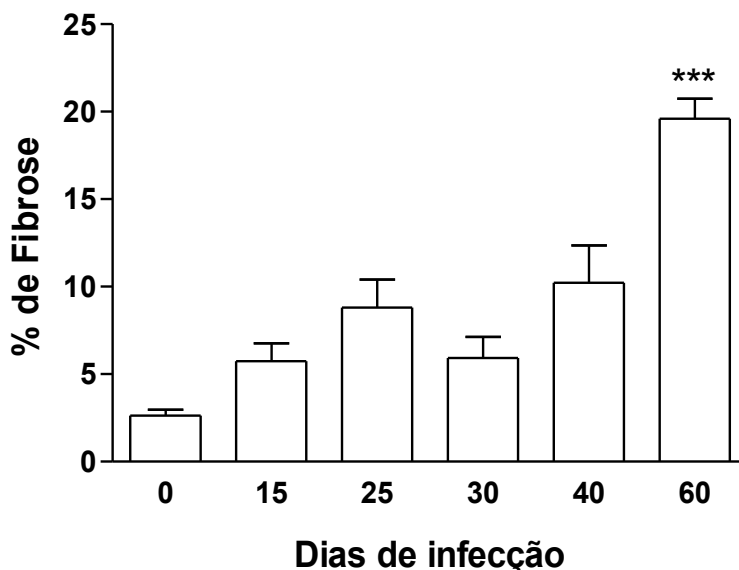


Figura 7: Porcentagem de fibrose no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes períodos de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. O percentual de fibrose foi quantificado por morfometria em secções de coração coradas por picrossírius vermelho. Os dados representam a média \pm SEM de 5-6 animais por grupo. *** $P < 0.001$.

5.3 Expressão gênica de fatores de crescimento e de TNF- α

A expressão gênica dos fatores de crescimento relacionados à neovascularização (VEGF) e à regeneração tecidual (HGF e IGF-1) e de TNF- α no tecido cardíaco foi quantificada ao longo da infecção aguda por *T. cruzi*, pela técnica de PCR em tempo real.

A expressão de VEGF tende a aumentar em relação aos valores normais por volta do 25º dia, embora as diferenças encontradas não sejam estatisticamente significativas pela análise de variância ($p = 0.7960$; Figura 8).

Figura 8

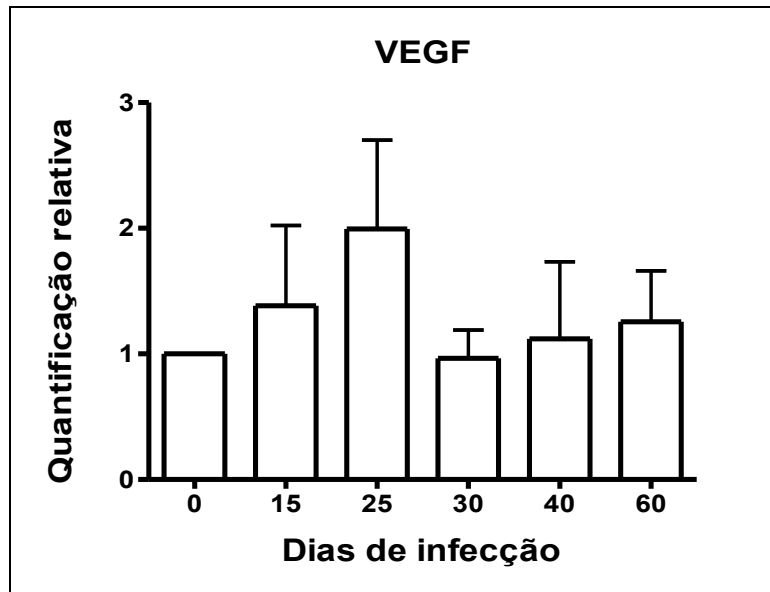


Figura 8: Análise da regulação da expressão gênica de VEGF no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes períodos de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Fragmentos dos corações foram utilizados para obtenção de mRNA e a análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real. Os dados representam a média \pm SEM de 3-6 animais por grupo.

A análise utilizando o teste do qui-quadrado demonstrou que não houve aumento significativo (igual ou maior que 2 vezes o controle) da expressão de VEGF no tecido cardíaco no decorrer da infecção, quando comparados com o grupo de animais não infectados (Tabela2).

Tabela 2: Comparação de alterações na expressão de VEGF entre animais normais e infectados com *T.cruzi*

VEGF			
	Normal	Infectado	Total
< 2.0 (-)	6	17	23
≥ 2.0 (+)	0	6	6
Total	6	23	29

Teste do qui-quadrado com correção de Yates: $p= 0,4015$

Houve uma diminuição da expressão do HGF durante a infecção quando comparadas com animais normais, com uma tendência a aumento por volta do 60º dia de infecção, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas pela análise de variância ($p=0.3446$; Figura 9).

Figura 9

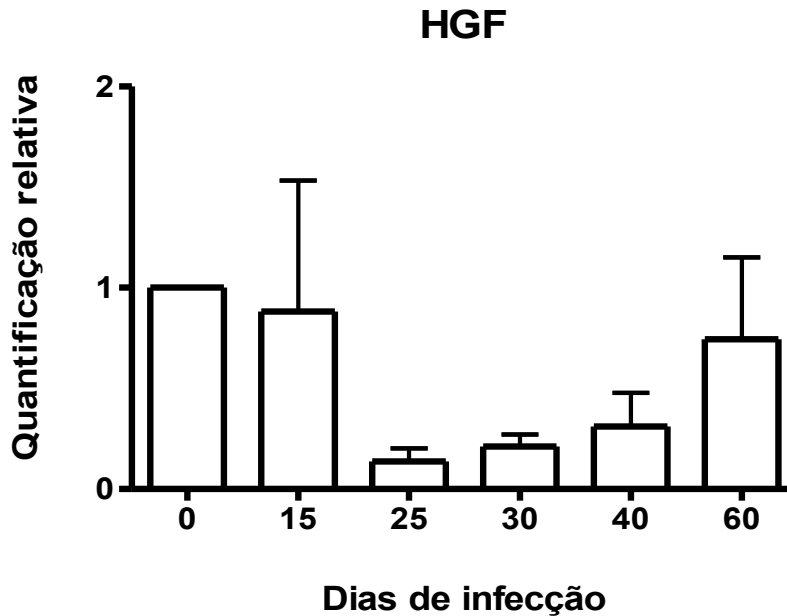


Figura 9: Análise da regulação da expressão gênica de HGF no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes períodos de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Fragmentos de corações foram utilizados para obtenção de mRNA e a análise da regulação da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real. Os dados representam a média ± SEM de 3-6 animais por grupo.

A análise de correlação entre a inflamação e expressão de HGF mostra uma correlação inversa entre estes parâmetros no tecido cardíaco, indicando que a infecção aguda por *T. cruzi* inibe a expressão do HGF nos cardiomiócitos (Figura 10). Esta relação também pode ser observada na figura 9, pois apesar do HGF apresentar uma diminuição na expressão durante a infecção quando comparado com os animais não infectados, a expressão tende a aumentar no final da fase aguda, coincidindo com a diminuição da inflamação e o controle da parasitemia.

Figura 10

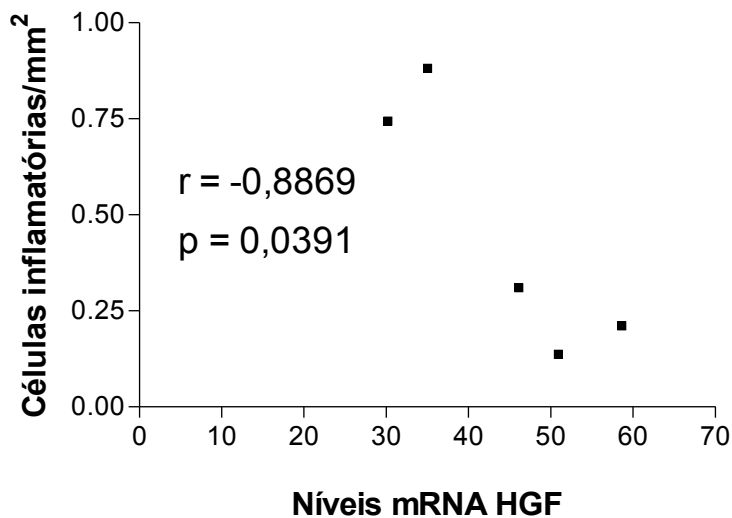


Figura 10: Análise de correlação entre inflamação e HGF. A análise entre a expressão de HGF e a inflamação foi feita a partir da correlação entre a média dos grupos dos animais (3 a 6 animais por grupo), em diferentes dias de infecção.

A análise utilizando o teste do qui-quadrado demonstrou que houve uma redução significativa (menor ou igual a 0.5) na expressão do HGF no tecido cardíaco, quando comparados com o grupo de animais não infectados (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação de alterações na expressão de HGF entre animais normais e infectados com *T.cruzi*

	HGF		Total
	Normal	Infectado	
> 0.5 (-)	6	4	10
≤ 0.5 (+)	0	18	18
Total	6	22	28

Teste do qui-quadrado com correção de Yates: $p = 0,013$

Em relação à expressão de IGF-1, há um aumento da expressão ao longo da infecção, observando-se uma significância estatística no 15° e 25° de infecção com uma diminuição por volta do 30° dia de infecção, e uma tendência a aumento no 60° de infecção pela análise de variância ($p < 0,05$; Figura 11).

Figura 11

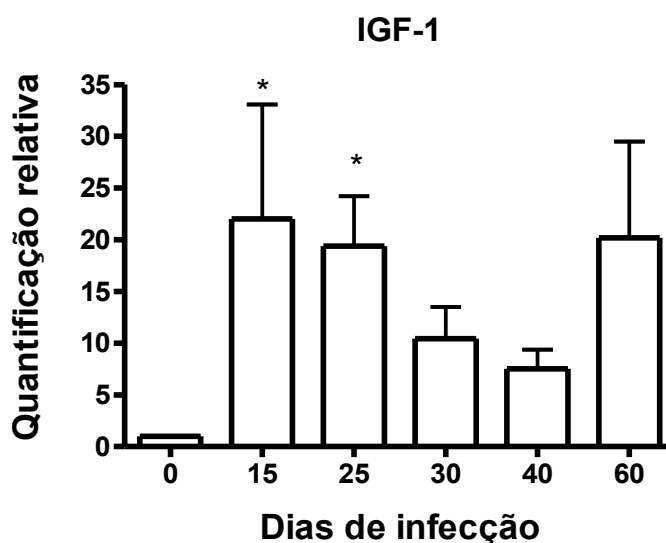


Figura 11: Análise da regulação da expressão gênica de IGF-1 no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes períodos de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Fragmentos do coração foram utilizados para obtenção de mRNA e a análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real. Os dados representam a média \pm SEM de 3-6 animais por grupo.

A análise utilizando o teste do qui-quadrado demonstrou um aumento significativo (igual ou maior que 2 vezes o controle) na expressão do IGF-1 no tecido cardíaco no decorrer da infecção, em comparação com o grupo de animais não infectados (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação de alterações na expressão de IGF-1 entre animais normais e infectados com *T.cruzi*

IGF- 1			
	Normal	Infectado	Total
< 2.0 (-)	6	0	6
≥ 2.0 (+)	0	23	23
Total	6	23	29

Teste do qui-quadrado com correção de Yates: $p= 0,0001$

Correlacionando-se a expressão de IGF-1 com os níveis de parasitemia (Figura. 12), observa-se uma correlação inversa entre estes dois parâmetros, indicando que o aumento da parasitemia diminui a expressão de IGF-1 no tecido cardíaco. Esta inibição pode ser observada com uma tendência diminuição da expressão do IGF-1 no 30º dia de infecção (Figura 11) que corresponde ao pico de parasitemia (redução de aproximadamente 2 vezes).

Figura 12

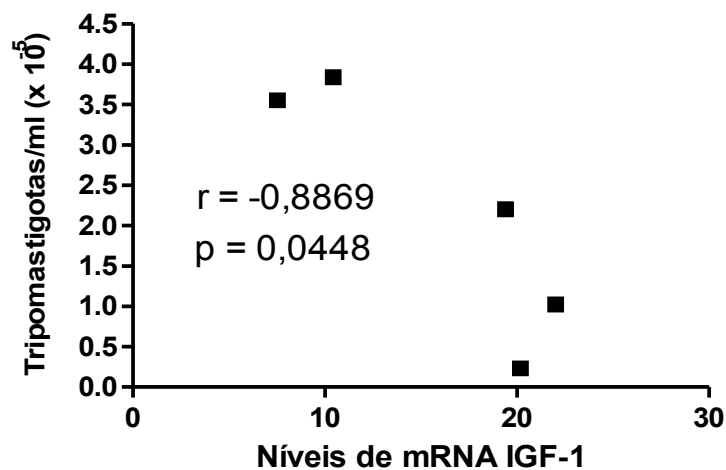


Figura 12: Análise de correlação entre expressão de IGF-1 e parasitemia. A análise da expressão de IGF-1 e a parasitemia foi feita a correlação (teste de Pearson) entre a média dos grupos dos animais (3 a 6 animais por grupo), em diferentes dias de infecção.

Foi observado um aumento da expressão de TNF- α em relação aos animais normais no 15º de infecção com diminuição da expressão após esse período e tendência a aumento no 60 dias de infecção, ($p= 0.0094$; Figura 13).

Figura 13

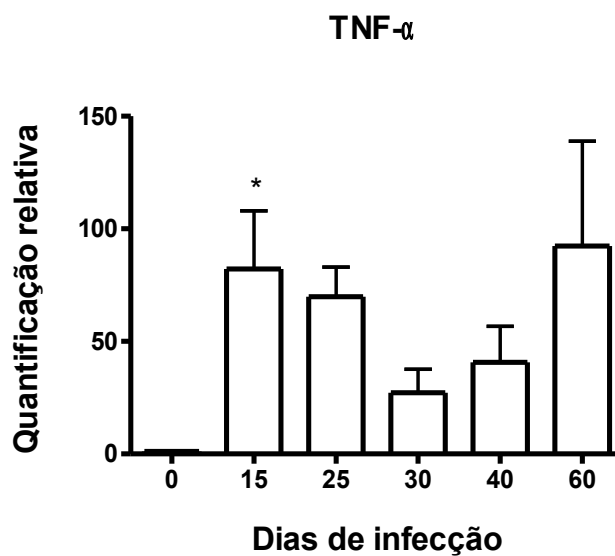


Figura. 13: Análise da regulação da expressão gênica de TNF- α no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram sacrificados em diferentes períodos de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Fragmentos do coração foram utilizados para obtenção de mRNA e análise da regulação da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real. Os dados representam a média \pm SEM de 3-6 animais por grupo.

A análise utilizando o teste do qui-quadrado comprovou que houve um aumento significativo na expressão do TNF- α no tecido cardíaco durante a infecção (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação de alterações na expressão de TNF- α entre animais normais e infectados com *T.cruzi*

TNF- α			
	Normal	Infectado	Total
< 2.0 (-)	6	0	6
\geq 2.0 (+)	0	22	22
Total	6	22	28

Teste do qui-quadrado com correção de Yates: $p=0,0001$

A parasitemia está inversamente correlacionada à expressão de TNF- α indicando que o aumento da parasitemia reduz a expressão dessa citocina no tecido cardíaco (Figura 14). Esse resultado também pode ser observado no gráfico de expressão de TNF- α no tecido cardíaco (Figura 13), no qual há uma diminuição no 30° dia de infecção, ou seja, no pico de parasitemia (cerca de 3 vezes menos do que no 15° dia).

Figura 14

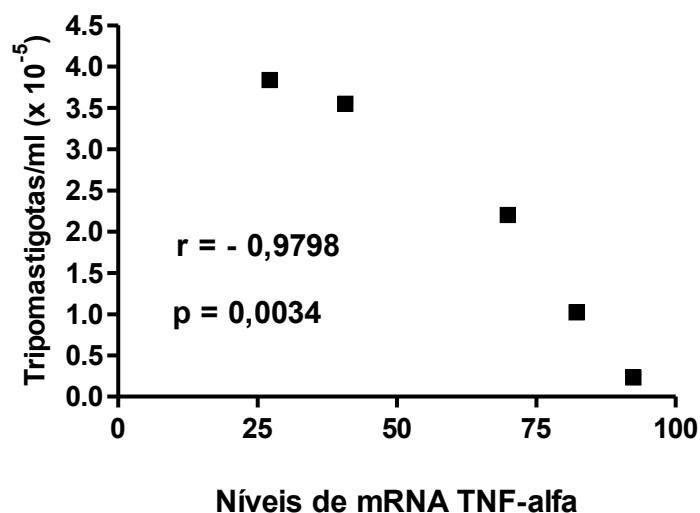


Figura 14: Análise de correlação entre TNF- α e parasitemia. Para a análise entre a expressão de TNF- α e parasitemia, foi feita a correlação (teste de Pearson) entre a média dos grupos dos animais (3 a 6 animais por grupo), em diferentes dias de infecção.

Evidências na literatura demonstram que a interação entre TNF- α e IGF-1 podem modular funções biológicas no tecido cardiovascular (NIEBAUER et al.,1998; WANG et al., 2003).

A análise de correlação da expressão de TNF- α e de IGF-1 indica que há uma correlação positiva entre estes dois fatores (Figura 15).

Figura 15

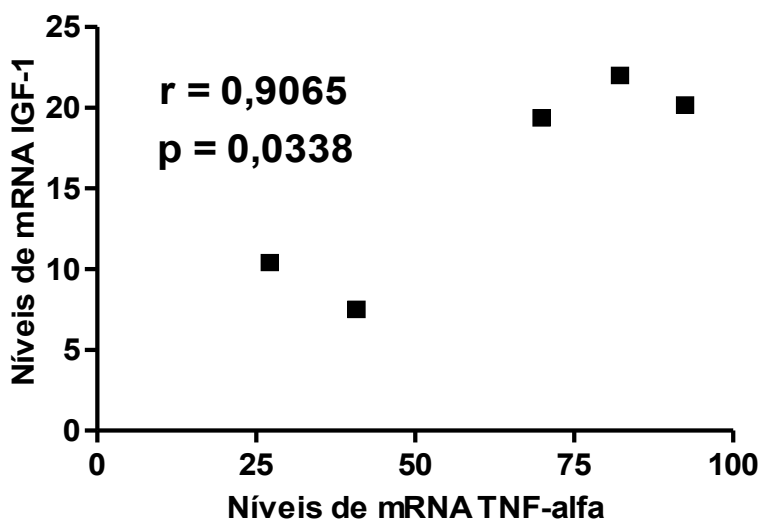


Fig. 15: Análise de correlação entre a expressão de TNF- α e de IGF-1. A análise entre a expressão de TNF- α e IGF-1 foi feita baseada na correlação (teste de Pearson) entre a média dos grupos dos animais (3 a 6 animais por grupo), em diferentes dias de infecção.

DISCUSSÃO

A infecção aguda por *T. cruzi* é altamente lesiva para o miocárdio. Camundongos C57Bl/6 são descritos como resistentes à infecção, controlando as formas circulantes ou tripomastigotas no sangue e apresentando uma recuperação considerável dos danos cardíacos causados durante a infecção aguda. Sendo assim, este é um modelo interessante para o estudo da expressão de fatores e citocinas associados à lesão e ao reparo do tecido cardíaco.

O pico de parasitismo tecidual (no coração) precede o da parasitemia, uma vez que encontramos mais ninhos no 15º dia, sendo decrescente após este período. Com o rompimento dos ninhos após o 15º dia, deve ocorrer uma liberação massiva de parasitas, que causa o aumento de parasitemia além do aumento da destruição de fibras. A liberação de parasitas causa o influxo de células no tecido, devido liberação de antígenos e um aumento da resposta inflamatória que libera mediadores aumentando a permeabilidade vascular e por isso o pico de inflamação é coincidente com o pico de parasitemia. Esta migração intensa de macrófagos e linfócitos T na fase aguda da infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* é dependente da expressão do receptor de quimiocinas CCR5, e parece ser importante para o controle do parasitismo no coração e da parasitemia (HARDISON *et al*, 2006).

A parasitemia durante a infecção pela cepa Colombiana evolui lentamente, atingindo níveis elevados entre o 20º e o 30º dias, com nítido miotropismo que determina uma miocardite progressiva e miosite nos camundongos (ANDRADE, 2000b). A fase aguda é caracterizada por uma parasitemia alta, por uma disseminação grande dos parasitos e uma imunossupressão marcante (MINOPRIO *et al.*, 1989). A expressão de IGF-1, e do TNF- α apresentou uma tendência à diminuição e o HGF apresentou uma tendência a supressão no pico de parasitemia, sugerindo que o aumento de parasitos, de algum modo, inibe a expressão desses genes localmente, que tende a aumentar novamente com o controle da parasitemia no final da fase aguda.

O TNF- α é bem descrito na literatura como importante no controle do parasitismo na infecção por *T. cruzi* sendo assim é esperado que um aumento do número de parasitos coincida com a diminuição dos níveis de RNAm para TNF- α .

Diversos trabalhos na literatura têm apontado o aumento do fator HGF em situações de lesões cardíacas com um fator cardioprotetor (ZHU *et al*, 2000; NAKAMURA *et al*, 2000b; KITTA *et al*, 2003; YASUDA *et al.*, 2000). ONO e colaboradores (1997) descreveram um rápido aumento da expressão de HGF no rim, fígado, pulmão e baço, no modelo de isquemia e reperfusão do miocárdio, além do aumento de receptor específico para HGF, o c-

met, no coração. Portanto, embora a produção local de HGF esteja suprimida pela infecção aguda por *T. cruzi*, é possível que este ainda participe da regeneração do miocárdio através da sua produção em outro órgão e migração pela circulação (efeito endócrino). Para melhor esclarecer o papel do HGF na regeneração ou reparo do tecido cardíaco na infecção por *T. cruzi*, outras metodologias, tais como o ELISA para quantificação sorológica deste fator e a análise da expressão de c-met no tecido cardíaco, devem ser aliadas.

O HGF tem uma ação imunossupressora já descrita, sendo o seu uso apontado como uma nova estratégia de tratamento para doenças auto-imunes e cardiopatia alérgica (KUROIWA *et al.*; 2006, FUTAMATSU *et al.*; 2005). O HGF inibe o desenvolvimento de miocardite autoimune experimental através da indução de citocinas tipo Th2 e supressão de citocinas Th1 (FUTAMATSU *et al.*; 2005). Na fase aguda da infecção por *T. cruzi* há uma produção de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune (CUNHA- NETO *et al.*,1998). Camundongos deficientes na produção de IL-4 apresentam uma exacerbação da resposta Th1 (aumento de IFN- γ) e intensa miocardite na infecção por *T. cruzi*, sugerindo que um balanço entre respostas Th1 e Th2 é importante para a modulação da resposta inflamatória no coração (SOARES *et al.*,2001c). Portanto, mecanismos de aumento da expressão de HGF poderão ter ação benéfica no tratamento da cardiopatia chagásica, tanto pelo reparo tecidual induzido por esse hormônio celular, quanto pela modulação da resposta Th1, que é patogênica na miocardite chagásica (SOARES *et al.*, 2001b).

A produção dos quatro tipos de inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs 1-4) no coração e em cardiomiócitos tem sido descrita (LI *et al.*, 1999). A expressão do TIMP-1 é induzida por uma variedade de estímulos, incluindo citocinas pró-inflamatórias. Na infecção por *T. cruzi*, a expressão de TIMP-1 está aumentada no coração (dados não publicados), e pode ter importante papel no acúmulo de fibrose no coração após lesão causada pela resposta inflamatória. O TIMP-1 foi descrito por MOHAMMED e colaboradores (2005) como um regulador negativo da produção de HGF durante a recuperação hepática. Deste modo, o aumento da expressão de TIMP-1 na infecção por *T. cruzi* pode estar causando a supressão da expressão do HGF observada em nosso estudo. Neste estudo não foi feita a correlação entre expressão de TIMP-1 e redução do fator HGF, porém essa análise poderá ser feita futuramente neste modelo.

Dentre os seis membros da família do VEGF, o VEGF-A é o mais descrito na literatura relacionado ao processo de angiogênese (NEULFELD *et al.*, 1999). ARAKAWA e colaboradores (2003) relataram uma diminuição da produção de VEGF através da técnica de ELISA no soro de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. ABRAHAM e

colaboradores (2000) relataram uma diminuição na expressão de mRNA e da proteína VEGF-A em pacientes com cardiopatia dilatada. Em pacientes com cardiopatia isquêmica houve um aumento da expressão de mRNA para VEGF-A e em ambos os casos houve aumento da expressão do mRNA e da proteína VEGF-C quando comparados com pacientes normais. Outros membros da família do VEGF estão associados com angiogênese podendo ser importantes na regeneração da infecção por *T. cruzi* e não foram analisadas neste estudo (HOLMES *et al.*, 2005).

O IGF-1 seja apontado como um fator indutor de reparo de tecidos lesados, juntamente com o HGF. WELCH e colaboradores (2002), utilizando animais provenientes do cruzamento entre camundongos transgênicos para cardiopatia dilatada e camundongos transgênicos para IGF-1, demonstraram que houve a redução da apoptose e da necrose em miócitos cardíacos nos camundongos F1. Estes dados sugerem que o aumento da expressão de IGF-1 no coração de camundongos infectados por *T. cruzi* observado em nosso estudo tem um papel protetor. Futuramente neste modelo pretendemos analisar apoptose pela técnica TUNEL e analisar proliferação celular através da injeção de BRDu antes do sacrifício dos animais.

Em nosso estudo observamos uma correlação positiva entre a expressão dos genes de IGF-1 e TNF- α . Há evidências na literatura de que a interação entre as vias de TNF- α e IGF-1 pode modular funções biológicas no tecido cardiovascular. PELOSI e colaboradores (2007), utilizando camundongos transgênicos com expressão muscular local para IGF-1, demonstraram após lesão muscular, um processo de regeneração acelerado.

VALLEE e colaboradores (2003) sugeriram que a citoproteção conferida pelo IGF-1 está associada à diminuição da expressão do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) induzida pelo TNF- α . Por ser um fator de transcrição de vias da resposta inflamatória, o NF- κ B está envolvido na regulação dos genes da resposta inflamatória, na apoptose, na proliferação celular e no aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) (WINTHER *et al.*, 2005).

A regeneração e o reparo muscular ocorrem em quatro fases interdependentes: lesão, inflamação, regeneração e fibrose. O controle da fase inflamatória é um componente crítico para a resposta regenerativa (TIDBALL, 2005). REIS e colaboradores (1997) relataram uma produção significativa de TNF- α no infiltrado inflamatório na cardiopatia chagásica. O miocárdio é uma fonte importante de produção de TNF- α . Portanto, é possível que, no nosso modelo, o TNF- α no coração seja produzido tanto por cardiomiócitos quanto por células do infiltrado inflamatório. O maior nível de RNAm para TNF- α não coincide com o pico de

parasitemia e inflamação, sugerindo que na cardiopatia chagásica há de fato a produção deste fator por cardiomiócitos, como sugerido anteriormente por estudos *in vitro* (MACHADO *et al.*, 2000).

Não há relatos na literatura de produção de IGF-1 por células inflamatórias sugerindo que o aumento dos níveis de RNAm para IGF-1 neste modelo foi produzido pelos cardiomiócitos. OPGAARD E WANG, 2005 descreveram o aumento da expressão de IGF-1 como um fator cardioprotetor poderemos relacionar esse papel melhor neste modelo com a associação de novas técnicas já citadas como TUNEL e BRDu.

Na fase aguda da infecção o TNF- α é importante no controle da parasitemia (LIMA *et al.*, 1997). Apesar de ter um efeito protetor na infecção, a alta produção de TNF- α no coração é patogênica para o miocárdio. A utilização de bloqueadores do TNF- α , como anticorpos anti-TNF- α , em modelos experimentais de cardiopatia demonstrou uma reversão na depressão do miocárdio e no tônus vascular e redução do infiltrado inflamatório intersticial, apesar da persistência da hipertrofia e da fibrose (PORAT *et al.*, 1995, KUBOTA *et al.*, 2000). Além de induzir vários distúrbios funcionais, a alta produção de TNF- α causa acúmulo de fibrose (SABA *et al.*, 2005). De fato, em nosso estudo foi observado que, ao final da fase aguda, quando a parasitemia e a inflamação diminuíram, o aumento progressivo de fibrose ocorreu concomitante a um novo aumento da expressão de TNF- α no coração.

Além do aumento do TNF- α , a expressão do gene do HGF, que é um fator capaz de diminuir a fibrose em modelos de lesão cardíaca (NAKAMURA *et al.*, 2005a), foi suprimida durante toda a fase aguda da infecção por *T. cruzi*. A modulação da expressão destes fatores poderá ser importante para a redução do acúmulo de tecido fibroso que ocorre a partir do fim da fase aguda até a crônica e que contribui para a disfunção cardíaca na doença de Chagas (ANDRADE, 2000). Não houve correlação. O estudo de outros fatores associados a produção de fibrose como TGF- β deverão ser analisados neste modelo correlacionando com HGF na tentativa de elucidar a importância do mesmo na diminuição da fibrose.

Neste modelo não houve correlação entre a fibrose com os fatores de crescimento e/ou citocinas (dados não mostrados).A falta de correlação pode ser devido ao pequeno número de animais utilizados neste estudo.

Embora o HGF e VEGF tenham diversas funções descritas na literatura, o aumento da expressão destes fatores tem sido associado a condições de hipóxia. REHMAN e colaboradores (2004) demonstraram que células progenitoras de adipócitos aumentam a secreção de VEGF e HGF em condições de hipóxia.

Analisando a expressão de mRNA para VEGF em pacientes com cardiopatia isquêmica e dilatada, ABRAHAM e colaboradores (2000) observaram um aumento da expressão de VEGF somente nos pacientes com cardiopatia isquêmica. Arakawa e colaboradores (2003), revisando resultados encontrados em diferentes situações de insuficiência cardíaca congestiva, concluíram que a diminuição do VEGF na circulação é devido a uma diminuição da produção do VEGF no tecido cardiovascular. A miocardite chagásica aguda, embora seja observada uma vasculopatia com áreas de microinfarto, é uma patologia multifatorial (ROSSI *et al.*, 1996; HASSAN *et al.*, 2006). De fato, nossos resultados não demonstraram um aumento da expressão de VEGF no tecido cardíaco, corroborando com os achados de literatura na qual se obtém um aumento VEGF somente em cardiopatias de etiologia isquêmicas. Outros fatores relacionados com angiogênese como VEGF-C que se encontram aumentados em situações de cardiopatia dilatada deve ser analisados neste modelo.

Os resultados encontrados em nosso estudo abrem novas perguntas sobre a presença de inibidores da transcrição, e outros fatores que podem ser de importância em determinadas fases da infecção, que devem ser alvo de investigação para o melhor entendimento do papel destes mediadores solúveis no modelo de infecção por *T. cruzi* em camundongos, envolvidos nos mecanismos de destruição e de reparo do miocárdio. Esse conhecimento poderá abrir novas portas para o desenvolvimento de terapias baseadas nesses e em outros fatores de crescimento e estimulação celular, que venham a intervir nos processos de patologias cardíacas, em especial para a cardiopatia chagásica crônica, que é a principal causa de óbito na doença de Chagas.

SÚMÁRIO DE RESULTADOS

- A infecção aguda por *T. cruzi* aumenta os níveis de RNAm para IGF-1 e TNF- α e diminui os níveis de RNAm para HGF.
- Os níveis de mRNA dos genes HGF, IGF-1 e TNF- α apresentou uma correlação negativa com a parasitemia e a inflamação na fase aguda da infecção por *T. cruzi*.
- Os níveis mRNA para o gene de VEGF não foi significativamente alterada no decorrer da infecção.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM,D; HOFBAUER,R; SCHÄFER,R; BLUMER,R;PAULUS, P;ET AL.Selective downregulation of VEGF-A165, VEGF-R1, and decreased capillary density in patients with dilative but not ischemic cardiomyopathy. *Circ Res.* v.87,p.644-647, 2000.

ALBERTS,B.; JOHNSON,A.; LEWIS,J.; RAFF,M.; ROBERTS,K.; WALTER,P. **Biologia molecular da célula.** 4 Ed;Porto Alegre:Artmed, 2006.

ANDRADE,A.Z. Patologia da doença de chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, A. Z.; NETTO- BARRAL, M. **Trypanossoma Cruzi e doença de Chagas.**2 Ed;Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000a.

ANDRADE,G.S.Influence of *Trypanossoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Mem. Inst Oswaldo Cruz.** v.85, p.17-27,1990.

ANDRADE,G.S. Patologia experimental da doença de chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, A. Z.; NETTO- BARRAL, M. **Trypanossoma Cruzi e doença de Chagas.**2 Ed;Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000b.

ANVERSA,P.; NADAL-GINARD,B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. **Nature.**v.415,p.240-243, 2002.

ARAKAWA,H; IKEDA,U; HOJO,Y; UENO,S; NONAKA-SARUKAWA,M; YAMAMOTO,K; SHIMADA,K. Decreased serum vascular endothelial growth factor concentrations in patients with congestive heart failure. **Heart .**v.89,p.207–208,2003.

BASQUIERA, L. A.; SEMBAJ, A; AGUERRI, M.A. OMELIANIUK, M. GUZMÁN,S.; BARRAL,M.J.; CAEIRO,F.T;MADOERY, J.R.;SALOMONE, A.O. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and parasitaemia detected by polymerase chain reaction. **Cardiovascular Medicine.** v,89, p.1186-1190, 2003.

BELTRAMI,P.A.;URBANEK,K.;KAJSTURA,J.; YAN,M-S.;ET AL. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. **N Engl J Med**.v.344,n.23,p. 1750-1757,2001.

BUSSOLINO,E.; RENZO DI,E.M.; ZICHE,M.; BOCCHIETTO,E.;ET AL. Hepatocyte growth stimulates endothelial cell motility and growth. **The journal of cell biology**.n.3, v.119,p. 629-641, 1992.

BUERKE,M.; MUROHARA,T.; SKURK,C.;NUSS,C.;ET AL. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor in myocardial ischemia followed by reperfusion. **Physiology**. v.92, p. 8031-8035, 1995.

CASTANOS-VELEZ, E.; MAERLAN ,S.;OSORIO, L.M.;ET AL. Trypanosoma cruzi infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. **Infect Immun**.v.66,n.6, p.2960-2968, 1998.

CASTRO,S.M.A.; GUERRA-JÚNIOR,G. GH/IGF e neoplasia: O que há de novo nesta associação. **Arq Bras Endocrinol Metab**.v.49, n.5,p. 833-842, 2005.

CHANDRA,M.;TANOWITZ,B.H.; PETKOVA,B.S.;ET AL. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi (Tulahuen strain). **International Journal for Parasitology** .v.32 ,p.897–905,2002.

COURA, R.J. Tripanosomose, Doença de Chagas. **Ciencia e Cultura**, v.55, n.1, não paginado, 2003.

CUNHA-NETO,E; RIZZO,L.V;ALBUQUERQUE,F;ABEL,L;GUILHERME,L;ET AL. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.v. 131,p. 133-137, 1998.

DAVANI,Y.E.;BRUMME,Z.; SINGHERA,K.G.;ET AL. Insulin-like growth factor-1 protects ischemic murine myocardium from ischemia/reperfusion associated injury. **Critical Care**.v.7,n.6,p.176-183, 2003.

DE JESUS, P.R.; CAMPOS, J.F.W. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Rev Ass Med Brasil**.n. 46,v. 6 , p.242- 254, 2000.

DIAS, J.C.P. The treatment of Chagas Disease (South American trypanosomiasis) **Ann Intern Med**. n.144, v.10, p.772-774, 2006a.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cad. Saúde Pública**, R.J.n.22, v.10, p.2020-2021, 2006b.

FAN,S.;MA,X.Y.;WANG,J.;YUAN,R.; ET AL. The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidyl inositol 3' kinase. **Nature**.n.19, p.2212-2223, 2000.

FEDERICI, E.E; ABELMANN ,W.H; NEVA ,F. A. Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg** v.13,p.272-280,1964.

FERRARA,N; GUEBER,P-H;LECOUTER,J.The biology of VEGF end its receptors. **Nature**. v.9, n.6, 2003.

FINKEL, M.S.; ODDIS, C.V.; JACOB, T.D.;WATKINS,S.C.; ET AL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. **Science**. v. 257,n.5068, p. 387-389, 1992.

FUTAMATSU,H; SUZUKI,J-I ; MIZUNO,S;KOGA,N; ADACHI,S;ET L.Hepatocyte Growth Factor Ameliorates the Progression of Experimental Autoimmune Myocarditis. A Potential Role for Induction of T Helper 2 Cytokines. **Circ Res**.n.96,p.823-830.

GABRILOVICH,I.D.; DIKOV,M.M. Vascular endothelial growth factor. In: THOMSON,W.A.;LOTZE,T.M. **The cytokine handbook**.4 ed. North Yorshire: Elsevier Science, 2003.p.1017-1028.

GARCIA, M.; MARTINS, S.L. ZOONOSE. Disponível em: <http://www.mgar.com.br/zoonoses/aulas/aula_chagas.htm>. Acesso em 12/11/2007.

GIORDANO, J.F.; GERBER, P.-H.; WILLIAMS, P.-S.; VANBRUGGENS, N.; ET AL. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. **PNAS** .v. 98, n. 10, p.5780-5785, 2001.

GODARD, B.L.S. O espelho milagroso: o poder do camundongo. Ciencia, tecnologia e meio ambiente, não paginado, 2002.

GOHDA, E; TSUBOUCHI, H; NAKAYAMA, H; HIRONO, S; ET AL. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. **J Clin Invest**.v. 81, n.2, p 414–419, 1998.

GOLDENBERG, S; KRIEGER, A.M. Doença de Chagas novas perspectivas no diagnóstico imunológico. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, n.3, p.26-28, 1997.

GONÇALVES DE ARAÚJO, J.A; SABROZA, C.P; DA SILVA, F.R.F.L. Situação atual. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=131> > . Acesso em: 12 nov. 2007.

GOWDAK, W.H.L. Terapia celular em cardiologia. Disponível em:< <http://www.comciencia.br/reportagens/celulas/12.shtml>>. Acesso em: 02 dez. 2007.

GRAEFE, B.E.S.; MEYER, B.S.; MULLER MYHSOK, B.; RUSCHENDORF, F.; DROSTEN, C.; LAUE, T.; STEEG, C.; NURNBERG, P.; FLEISCHER, B. Murine susceptibility to chagas diseases maps to chromosomes 5 and 17. **Genes immunity**, v.4, p.321-325, 2003.

HARDISON, J.L; WRIGHTSMAN, R. A; CARPENTER, P. M; KUZIEL, W. A; LANE, T .E; MANNING ,J .E. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun** .v.74,n.1,p.135-43, 2006.

HEESCHEN C , DIMMELER S, HAMM W C, BOERSMA E, ZEIHNER M A, SIMMOONS L M. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. **Circulation** .n. 107, p.524-530, 2003.

HOEBEN,A.;LANDUYT,B.;HIGHLEY,S.BART.;WILDIERS,H.;ET AL. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**.n, 56. p, 549-580, 2004.

HOLMES,IR.D.; ZACHARY,I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and Disease. **Genome biology**.v.6,p. 209.1- 209.10, 2005.

HUSNAIN,K.H; ASHRAF,M. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair.**Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v, 288,p. 2557–2567, 2005.

JANEWAY,A.C; TRAVERS,P; WALPORT,M; SHLOMCHIK,M. **Imunobiologia. O sistema immune na saúde e na doença**.5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2002.

JONES,I.J.;CLEMMONS,R.D. Insulin –like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine review**.v.18,n.1,1995.

KAJSTURA,J.;LERI,A.;FINATO,N.;DI LORETO,C.;ET AL. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. **Proc Natl. Acad. Sci**. v.95, p.8801-8805, 1998.

KITTA K, DAY RM, KIM Y TORREGROZA I, EVANS T, SUZUKI Y J. Hepatocyte growth factors induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. **J. Biol Chem**. n.7, v 278,p 4705-4712, 2003.

KUBOTA,T; BOUNOUTAS, S.G;MIYAGISHIMA,M; KADOKAMI,T;ET AL. Soluble tumor necrosis factor receptor abrogates myocardial inflammation but not hypertrophy in cytokine-induced cardiomyopathy. **Circulation**. v.101, n.21, p.2518-2525, 2000.

KUROIWA,T; IWASAKI,T IMADO,T; SEKIGUCHI,M; FUJIMOTO,J; SANO,H. Hepatocyte growth factor prevents lupus nephritis in a murine lupus model of chronic graft-versus-host disease. **Arthritis Research & Therapy**.v, 8,n.4,p.123-132, 2006.

LANNES, J; KROPF, S. A Doença. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=91> >. Acesso em 29 out.2007.

LIMA, E.C.; GARCIA, I.; VICENTELLI, M.H.; ET AL. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect Immun.** n.2, v. 65, p. 457-465, 1997.

LI, Q.; LI, B.; WANG, X.; LERI, A.; JANA, P.K.; ET AL. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* v.100, n.8, p.1991-1999, 1997.

LI, Y.Y.; MCTIERNAN, C.F.; FELDMAN, A.M. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. **Cardiovasc Res.** N. 42, p.162-172, 1999.

MACHADO, S.F.; MARTINS, A.G.; ALIBERTI, C.S.J.; MESTRINER, C.A.L.F.; ET AL. *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. **Circulation.** v.102, n.24, p.3003-3008, 2000.

MARTINELLI, M. P.; CAMARGOS DA SILVA, R.E.; AZEVEDO, A.A.; ET AL. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Autonomic Neuroscience: basic e Clinical.** n.130, p 32-40, 2006.

MARS, M.W.; LIU, Y.; MANGA, S.P.S. Hepatocyte growth factor and its receptor, MET. In: THOMSON, W.A.; LOTZE, T.M. **The cytokine handbook.** 4 ed. North Yorkshire: Elsevier Science, 2003. p.783-807.

MELDRUM, R.D. Tumor necrosis factor in the heart. **Am J Regulatory Integrative Comp Physiol.** n.274, p. 577-595, 1998.

MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. Immunobiology of Murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and activation of TCR I T cells. **Immunological reviews.** V.112, n.1, p. 183-207, 1989.

MOHAMED,F.F;PENNINGTON,J.C;KASSIRI,Z;RBIN,S.R;ET AL. Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration.**Hepatology**.v.41,p.857-867, 2005.

MORABITO,A; DE MAIO, E;DI MAIO,M;NORMANNO, M;PERRONE,F. Tyrosine Kinase Inhibitors of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Clinical Trials: Current Status and Future Directions.**The Oncologist**. n.11,p.753-764, 2006.

NAKAMURA, T; MATSUMOTO ,K; MIZUNO, S; SAWA, Y;ET AL. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.288,n.5,p.2131-2139,2005a.

NAKAMURA,T;MIZUNO,S;MATSUMOTO,K;SAWA,Y;MATSUDA,H;NAKAMURA,T. Myocardial protection from ischemia/ reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. **J. Clin. Invest**. n.106, p.1511-1519, 2000b.

NAKAMURA,T.; NAWA,K.; ICHIHARA,A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth from serum of hepatectomized rats. **Biochem Biophys Res Commun**. n.122, p.1450-1459, 1984c.

NEUFELD,G.; COHEN,T.; GENGRINOVITCH,S.; POLTORAK,Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **The FASEB journal**. v.13.p. 9-22,1999.

NIEBAUER,J. PFLAUM, D.C,CLARK,L.A,STRASBURGER,J.C,HOOPER ET AL. Deficient insulin –like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neuronal activation. **Journal of the American College of Cardiology**. n,2. v. 32, p. 393 – 397,1998.

OHTA ,H.; YATOMI, Y.; SWEENEY, E.A.; HAKOMORI, S. I .; IGARASHI ,Y. A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. **FEBS Let**. v. 355, n.3, p.267-270, 1994.

ONO,K;MATSUMORI,A;SHIOI,T; FURUKAWA,Y; SHIGETAKE,S. Enhanced Expression of Hepatocyte Growth Factor/c-Met by Myocardial Ischemia and Reperfusion in a Rat Model.**Circulation**.v.95,p.2552-2558.

OPIE, L. H .**Heart Physiology From Cell to Circulation**. 4 ed, Lippincott Williams e Wilkins, 2004.

OPGAARD,S.O; WANG,H.P.IGF-1 is a matter of heart. **Growth Hormone & IGF Research**. v. 15, p.89-94,2005.

PASSOS, C.A.L.; SAKURADA,K.J.; GUARALDO, A.M.; ORTIZ DA COSTA,B.C.S.; RANGEL DE ARAÚJO.; GUÉNET,L.J. Chagas, Fenomeno da resistência. **Biociência e desenvolvimento**.n.26, p. 26-31, 2004.

PELOSI,L; GIACINTI,C;NARDIS,C; BORSELLINO,G; EMANUELE RIZZUTI; ET AL. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokine and chemokines. **The FASEB journal**. v.21,p. 1393–1402, 2007.

PLANET-BÉNARD,V;MENARD,C;ANDRÉ,M; PUCEAT, M ;ET AL. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. v.94, p. 223-229, 2004.

PORAT ,R; PADDOCK, H. N; SCWAITZBERG, S .D; CONNOLLY, R. J ; ET AL. Glycosylated recombinant human tumor necrosis factor binding protein-1 reduces mortality, shock, and production of tumor necrosis factor in rabbit Escherichia coli sepsis. **Crit Care Med**.v.23, n.6,p.1080-1089, 1995.

RAJARAM,S. BAYLINK,J.D.; MOHAN,S. Insulin-like growth factor- binding proteins in serum and other biological fluids: Regulation and functions.**Endocrine review**.n.6, v.18,p.801-831, 1997.

RASSI,A. JUNIOR RASSI,A.RASSI,G.G. Fase aguda.**Trypanosoma cruzi e doença de chagas**. In: BRENER, Z.; ANDRADE, A. Z.; NETTO- BARRAL, M. Trypanossoma Cruzi e doença de Chagas.2 Ed;Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000.

REHMAN,J; TRAKTUEV,D; LI, JINGLING; CLAUSS-MERFELD,S;ET AL. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. **Circulation**.v.109,P.52-58, 2004.

REIS, M.M.;HIGUCHI,L.M.;AIELLO,D.V.;BENVENUTI,A.L. Fatores de crescimento presentes no miocardio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**.n33,v.6,p.509-518, 2000.

RIBEIRO DOS SANTOS,R.; SOARES,P.B.M.; CAMPOS DE CARVALHO,C.A. Transplante de células de medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v.37, n.6, p.490-495, 2004.

RICCI,G.; CATIZONE,A.; INNOCENZI,A.; GALDIERI,M. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Receptor Expression and Role of HGF during Embryonic Mouse Testis Development. **Developmental Biology**.n.216,p. 340-347, 1999.

ROSSI,A.M;RAMOS,G.S.Alterações microvasculares coronarianas na doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. V.66, n.3, p.169-175, 1996.

SABA ,S;JANCZEWSKI, A.M;BAKER ,L .C; SHUSTERMAN ,V; GURSOY ,E. C;FELDMAN, A .M;SALAMA, G; MCTIERNAN, C .F; LONDON, B. Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v.289, n.4, p.1456-1467, 2005.

SALMON, W.D.JR, DAUGHDAY, W.H. A hormonally controlled serum factor, which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **J Lab Clin Med**.n. 49,p. 825-836, 1957.

SAWYER ,D.B .; LOSCALZO, J. Myocardial hibernation: restorative or preterminal sleep?. **Circulation**. v. 105, n.13, p.1517-1519, 2002.

SETA ,Y.; SHAN, K.; BOZKURT, B.; ORAL, H.; MANN, D.L. J. Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. **J Card Fail**.v.2, n.3 ,p.243- 249, 1996.

SILVA DA ANTONIO, R.; CARVALHO DE ESTHER, M.; RODRIGUES, C.C.L.V. Doença de chagas . Disponível em: < http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/chagas/texto_chagas_pro.htm#hist_cchagas >. Acesso em :11 nov.2007.

SOARES, P.B.M.; PONTES DE CARVALHO,L.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Banco de embriões de camundongos geneticamente modificados. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**. n.20, p.50-53, 2004a.

SOARES, M. B. P.; PONTES DE CARVALHO, L. RIBEIRO DOS SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras.Cienc.** n,73 .v,4;,p. 547 -559, 2001b.

SOARES, M.B; SILVA-MOTA, K .N;LIMA ,R.S; BELLINTANI, 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**. v.159,n.2, p.703-709, 2001c.

SONNTAG,E.W.;RAMSEY,M.; CARTER,S.C. Growth hormone and insulin- like growth factor -1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. **Ageing Research Reviews**. n.4,p 195-212, 2005.

TAFURI, L.W.; LANA,M.; BAHIA,T.M.: CARNEIRO,C.M. O cão como modelo experimental para o estudo da doença de chagas. **Revista da pesquisa e pós graduação**. Disponível em < <Http://www.ufop.br/pesquisa/revista/acao.html> >. Acesso em 15/11/2007.

TANOWITZ, B.H.; KIRCHHOFF, V.L.; SIMON,D.; MORRIS,A.S.; WEISS,M.L.; WITTNER,M. Chagas diseases . **Clinical microbiology reviews**. v. 5, n. 4, p. 400 - 419, 1992.

TIDBALL, G.J; Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**. v. 288,p.345-353, 2005.

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; LUCAS, R.; ET AL. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** v.67,n.11, p.5579- 5586, 1999.

URBANEK, K.; CESSELL, I. D.; ROTA, M.; NASCIMBENE, ; DE ANGELI, A; HOSODA, T; BEARZI, C; BONI, A; BOLLI, R; KAJSTURA, J; ANVERSA P, LERI. A. Stem cell niches in the adult mouse heart. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v .103, n.24, p.9226-9231,2006.

VALLEE, S.; FOUCHIER. F.; BREMOND, P.; BRIAND, C.; MARVALDI, J.; Insulin-like growth factor-1 downregulates nuclear factor $\kappa\beta$ activation and upregulates interleukin-8 gene expression induced by tumor necrosis factor- α . **Biochemical and Biophysical Research Communications.** n.4. v. 305, p.831-839, 2003.

VERGANI, G.; LARH, G.; WANG, M. Z.; BARTKE, A.; MAYERHOFER. Visualizing the expression of a human growth hormone (hGH) transgene in the liver: intrahepatic regional and intracellular differences of expression are associated with morphological alterations and hepatocellular proliferation. **Tissue e Cell.** n. 29, v. 5, p. 611-616, 1997.

VILCEK, J. The cytokines: an overview. In: THOMSON, W. A.; LOTZE, T. M. **The cytokine handbook.** 4 ed. North Yorkshire: Elsevier Science, 2003. p.3-18.

WANG, H. P. Roads to survival. Insulin-like growth factor-1 signaling pathways in cardiac muscle. **Circulation Research.** n.88, p. 552-554, 2001.

WANG, M.; TSAI, B.; BROWN, W. J.; MELDRUM, R. D. Insulin-like growth factor-1 in myocardial tissue: interaction with tumor necrosis factor. **Critical Care.** n.7, p. 417-419, 2003a.

WANG, M.; CRISOSTOMO, R. P.; CHRISTINE, H.; KIRSTAN, K. M.; MELDRUM, R. D. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-1 in response to TNF- α by a p38 MAPK-dependent mechanism. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.291, p.880-884, 2006b.

WANG, M; TSAI, B.M; CRISOSTOMO, P. R; MELDRUM ,D.R. Pretreatment with adult progenitor cells improves recovery and decreases native myocardial proinflammatory signaling after ischemia. *Shock* . v.25, p.454–459, 2006c.

WELCH,S; PLANK, D;WITT,S; GLASCOCK,B; SCHAEFER,E; CHIMENTI,S; ANDREOLI,M.A;ET AL. Cardiac-Specific IGF-1 Expression attenuates dilated cardiomyopathy in tropomodulin-overexpressing transgenic mice. *Circ Res*. n.105,2002.

WINTHER, M. P. J; KANTERS, E; KRAAL, G; HOFKER, H. M. Nuclear factor B signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v.25,p.904-914, 2005.

YANG, Y.; MIN,J.Y.;RANA,J.S.;Q,Ke.;J.C.;ET AL. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC- differentiated cells. *J Appl. Physiol*. v.93, p.1140-1151, 2002.

YASUDA,S; GOTO, Y; BABA,T; SATOH,T; SUMIDA,H; MIYAZAKI,S;ET AL. Enhanced Secretion of Cardiac Hepatocyte Growth Factor from an infarct region is associated with less severe ventricular enlargement and improved cardiac function. *Journal of the American College of Cardiology*. v,36,n.1,p.115-121,2000.

YUAN, S.J.:REED,A.: CHEN,F.: STEWART,N. Statistical analysis of real-time PCR data.*BMC Bioinformatics*.v.7, n.85,p. 1-12, 2006.

ZANG,W.Y.;WOUDE VANDE,F.G. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *Journal of cellular biochemistry*. v.88, p.408-417, 2002.

ZHU,Y.;IKEDA.U.;SHIMADA,K.; Production of hepatocyte growth factor during acute myocardial infarction. *Heart*. v.83, p. 450-455,2000.