

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**LABORATÓRIO DE DOENÇA DE CHAGAS – NUPEB**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
CARDIOVASCULAR EM RATOS COM  
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR (2R1C)  
INFECTADOS PELO *Trypanosoma cruzi***

**Maíra Araújo Azevedo**

Orientador: **Prof. Dr. André Talvani**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre, em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunopatologia dos protozoários

**Ouro Preto, 2012**

Vá até onde puder ver; quando lá chegar  
poderá ver ainda mais longe.”

(GOETHE)

“O homem vive de razão e sobrevive de sonhos”

(Miguel de Unamuno y Jugo)

A994a      Azevedo, Máira Araújo.  
Avaliação da resposta inflamatória cardiovascular em ratos com hipertensão renovascular (2r1c) infectados pelo Trypanosoma cruzi [manuscrito] / Máira Araújo Azevedo. - 2012.  
82f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Alzamora .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.  
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Chagas, Doença de. 2. Trypanosoma cruzi . 3. Hipertensão renovascular .  
4. Inflamação. I. Silva, André Talvani Pedrosa da. II. Alzamora , Andreia . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.12-008.331|

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

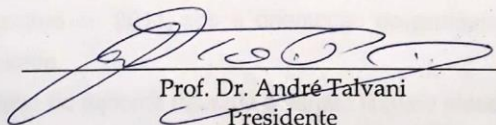


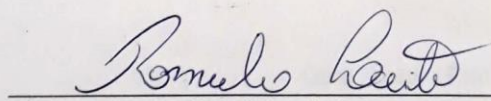
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

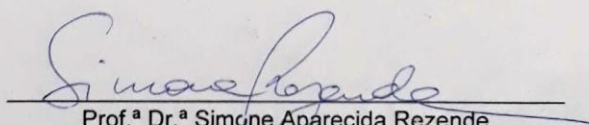
**“Avaliação da resposta inflamatória cardiovascular em ratos com hipertensão renovascular (2R1C) infectados pelo *Trypanosoma cruzi*”**

Aos dezoito dias do mês de Dezembro de 2012, às 09:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Maíra Araújo Azevedo**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por .....APROUAR..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
Prof. Dr. André Talvani  
Presidente

  
Prof. Dr. Rômulo Leite  
Examinador (CIPHARMA)

  
Prof.ª Dr.ª Simone Aparecida Rezende  
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: 18/12/2012

*A Deus,*  
*Pela saúde e por todas as graças concebidas*  
*“Tudo posso naquele que me fortalece...”*

*A minha vó Maria, amor maior,*  
*Exemplo de força, dedicação e amor incondicional, meu porto seguro!*

*Aos meus pais, Jacqueline e Sávio,*  
*Carinho, compreensão e incentivo em minhas escolhas, além de princípios e valores, educação*  
*que vai muito além dos livros.*

*Ao Gilson,*  
*Pelos conselhos e carinhos sempre presentes.*

*Ao meu irmão Rafael,*  
*Exemplo de dedicação, disposição e alegria de viver.*

*As minhas irmãs Beatriz e Sophia,*  
*Que mesmo longe se fazem tão presentes na minha vida e pensamentos. Exemplos!*

*A minha família,*  
*Em especial tias Tânia, Tereza e tio Jair exemplos de pessoas! Obrigada por sempre me*  
*apoiarem e darem força pra continuar esta caminhada*

*Ao meu amado Guilherme,*  
*Pelo amor, companheirismo, carinho, paciência, incentivo e compreensão. Agradeço pela*  
*alegria dos momentos vividos, pelo aprendizado em nossa caminhada e por tudo aquilo que*  
*ainda passaremos juntos. Te Amo!!*

*Obrigada a todos que direta ou indiretamente ajudaram a fazer desse sonho uma realidade!!!*

## ***Agradecimentos***

*Ao meu orientador Prof. Dr. André Talvani, pelas oportunidades proporcionadas, pela paciência e confiança, pelos ensinamentos e acima de tudo pela amizade.*

*A Profa. Dra. Terezinha Bahia, pelo exemplo, amizade, e presteza de seus ensinamentos.*

*A todos do Laboratório de Doença de Chagas, em especial Maria Cláudia Silva, Magna Guedes, Vivian Figueiredo, Tassiane Assíria, Guilherme Costa e Maykon Tavares. Amigos de todas as horas pelo incentivo, apoio, companheirismo, ensinamentos e diversão. Ao Diógenes Coelho- Júnior, Maria Cláudia Silva e Vivian Paulino Figueiredo por serem tão prestativos e sempre dispostos a ajudar neste projeto.*

*Ao Laboratório de Hipertensão (NUPEB) da UFOP, professora Andréia C. Alzamora por dividir comigo sua experiência, tornando possível a realização deste trabalho.*

*Ao Laboratório Conceição Machado da UFMG, professora Patrícia M. Martinelli e Carlos pela oportunidade de vivenciar novos conhecimentos, atenção e carinho.*

*Aos funcionários do Biotério que sempre estiveram dispostos a ajudar, em especial à Érika, Waltinho e Jorginho.*

*A Cida por toda ajuda, dedicação, carinho e amizade ao nosso programa e seus alunos*

*Aos colegas de mestrado, professores e colegas do NUPEB pelo convívio, auxílio e companheirismo. Em especial ao Leonardo S. Malverde e Manoel R. de Moura Júnior, peças fundamentais na indução da hipertensão*

*À Universidade Federal de Ouro Preto, gratuita e de qualidade, por todas as oportunidades e ensinamentos.*

*À CAPES e UFOP, instituições de apoio à pesquisa que proporcionaram condições para que este trabalho fosse realizado.*

*Agradeço profundamente às minhas irmãs de alma da inesquecível República Quarto Crescente.*

*Moradoras e ex-alunas pelo carinho, apoio e amizade verdadeira. Amo vocês!*

*Às amigas e companheiras de pesquisa, que talvez por conhecer os altos e baixos, estavam sempre dispostas a ajudar. Miriam Rodrigues, Vanessa Morais e Nilza Satie*

*Agradeço carinhosamente aos animais deste projeto, pois sem eles nada seria possível.*

## Sumário

Lista de Figuras e Tabela .....	ix
Resumo .....	x
Abstract.....	xi
1 – INTRODUÇÃO .....	11
1.1 – O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas .....	11
1.1.1 – Doença de Chagas e a inflamação .....	14
1.2 – Hipertensão arterial sistêmica .....	16
1.2.1 – Sistema renina angiotensina .....	17
1.2.2 – Hipertensão e a inflamação .....	21
1.2.3 – O modelo 2 rins 1 clip.....	23
1.3 – Hipertensão arterial sistêmica na doença de Chagas .....	26
2 – OBJETIVOS .....	28
2.1 – Objetivo geral .....	28
2.2 – Objetivos específicos .....	28
3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
3.1 – Animais.....	29
3.2 – Delineamento experimental .....	30
3.3 – Cirurgia Renovascular .....	31
3.4 – Padronização da concentração de parasitos e infecção com o <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	32
3.5 – Parasitemia.....	33
3.6 – Pletismografia digital .....	33
3.7 – Peso dos Animais.....	34
3.8 – Ensaio imunoenzimáticos - ELISAs .....	34

3.8.1 – Fractalkine/CX3CL1; Fator de Necrose tumoral-alfa/TNF- $\alpha$ e Angiotensina II.....	34
3.9 – Histopatologia.....	35
3.9.1 – Processamento histológico.....	35
3.9.2 – Análise morfológica qualitativa e quantitativa dos tecidos cardíacos.....	35
3.10 - Análise estatística .....	36
4 – RESULTADOS.....	37
4.1 – Infecção experimental pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
4.2 – Variação do peso corporal.....	38
4.3 – Parâmetros de pressão arterial sistólica e dosagem plasmática de Angiotensina II .....	40
4.4 – Frequência cardíaca .....	42
4.5 – Dosagem plasmática de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e fractalkine (CX3CL1) .....	43
4.6 – Avaliações histológicas .....	46
4.7 – Quantificação de ninhos de amastigotas nos tecidos .....	51
5 – DISCUSSÃO .....	53
6 – CONCLUSÃO .....	59
7 – REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	61



## Lista de Figuras e Tabela

Figura 1 – Morfologia do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
Figura 2 – Representação ilustrativa da cascata do sistema renina angiotensina .....	18
Figura 3 – Principais peptídeos biologicamente ativos do sistema renina angiotensina.	20
Figura 4 – Inflamação na hipertensão.....	22
Figura 5 – Mecanismo angiotensina-dependente ativado pela estenose unilateral da artéria renal. ....	25
Figura 6 – Foto do momento da cirurgia renovascular.....	32
Figura 7 – Curva de parasitemia com diferentes inóculos do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
Figura 8 – Curvas de parasitemia ..	38
Figura 9 – Acompanhamento do peso corporal .....	39
Figura 10 – Parâmetros pressóricos .....	40
Figura 11 – Avaliação dos níveis séricos de angiotensina II (Angio II).....	42
Figura 12 – Avaliação da frequência cardíaca.....	43
Figura 13 – Avaliação dos níveis séricos de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	44
Figura 14 – Avaliação dos níveis séricos de fractalkine/CX3CL1 .....	45
Figura 15 – Correlação dos níveis das citocinas fator de necrose tumoral-alfa e fractalkine .....	46
Figura 16 – Análise histopatológica para vasos e inflamação no experimento de 1 semana (1 semana de cirurgia e de infecção) .....	48
Figura 17 – Análise histopatológica para vasos e inflamação no experimento de 4 semanas (4 semanas de cirurgia e 1 de infecção): .....	49
Figura 18 – Análise histopatológica para vasos e inflamação no experimento de 8 semanas (8 semanas de cirurgia e infecção) .....	50
Figura 19 – Análise histopatológica para presença de ninhos de amastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	52
Tabela I – Quantificação de ninhos de amastigotas .....	51

## RESUMO

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), caracterizada pelo aumento de Angiotensina II plasmática/tecidual, é uma das doenças com maior prevalência no mundo moderno. Evidências apontam para o envolvimento da inflamação vascular no processo inicial da HAS. A cardiopatia chagásica é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, capaz de desencadear uma resposta inflamatória progressiva gerando importantes alterações elétricas e morfo-funcionais ao coração. Nosso objetivo neste estudo foi avaliar a associação da HAS e os aspectos inflamatórios cardiovasculares em animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi*. Ratos Wistars machos foram submetidos à cirurgia renovascular (modelo Goldblatt – 2Rins/1CLIP) ou à cirurgia fictícia (SHAM) e divididos e agrupados de acordo com a infecção ou não pelo *T. cruzi*. Foram realizados três experimentos em diferentes momentos da “infecção e cirurgia” para avaliação da HAS e do patológico induzido pelo parasito sendo (I) indução da HAS + infecção pelo *T. cruzi* (ao mesmo tempo), experimento teve duração de 1 semana; (II) indução da HAS + infecção com o *T. cruzi* 3 semanas após a cirurgia e (III) indução da HAS + infecção pelo *T. cruzi* (ao mesmo tempo) e experimento teve duração de 8 semanas. Nesse estudo, avaliou-se parâmetros fisiológicos e inflamatórios como pletismografia, Ang II e mediadores inflamatórios plasmáticos, parasitemia e achados histopatológicos no tecido cardíaco. Após a 3ª semana de cirurgia os animais apresentaram picos pressóricos havendo concordância com a produção de Angio II plasmática nas primeiras semanas, mas não se observando relação direta entre o aumento da pressão arterial e o número de parasitos circulantes. No entanto, o *T. cruzi* exerceu papel definidor na alta produção de TNF-alfa e da CX3CL1/Fractalkine e, em associação com a cirurgia renovascular, observou-se maior elevação nesses mediadores inflamatórios em diferentes etapas do estudo. Por outro lado, o aumento da pressão arterial não exerceu interferência no processo inflamatório tecidual nem na invasão tecidual pelo parasito, mas contribuiu para a manutenção do número de vasos sanguíneos após 8 semanas de experimento, quando houve diminuição no grupo de animais normotensos. Com este estudo conclui-se que o tempo de infecção pelo *T. cruzi* e o tempo de desenvolvimento da hipertensão interferem, mutualmente, no perfil inflamatório induzido pelo hospedeiro mamífero. No entanto, acredita-se também, que esse estudo fosse reproduzido em outro modelo experimental mais susceptível à infecção pelo *T. cruzi*, as lesões cardiovasculares seriam mais evidenciadas principalmente numa etapa crônica de ambas as doenças.

**Palavras chaves:** *Trypanosoma cruzi*, hipertensão arterial, Angiotensina II, Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), Fractalkine (CX3CL1)

## ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is characterized by the increase of plasma/tissue Angiotensin II (Angio II) and presents high prevalence in the world. There are evidences suggesting the involvement of vascular inflammation in the initial phase of SAH. Chagas cardiomyopathy is a disease caused by *Trypanosoma cruzi* infection that triggers a progressive inflammatory response with prominent fibrosis and, as a consequence, there are important cardiac electrical and functional disturbances and/or hypertrophy in this organ. Our aim in this study was evaluate SAH and the cardiovascular inflammation in Wistar rats infected by Y strain of *T. cruzi*. Male rats were submitted to renovascular surgery (Goldblat model – 2Kidneys/1CLIP) or to a fictional surgery (SHAM) and grouped according to infection or not by *T. cruzi*. It was proposed 3 experiments in different times of infection and surgery to evaluate the SAH and the pathological aspects induced by the parasite: (I) SAH induction and *T.cruzi* infection at same time – experiment occurred in one week; (II) SAH induction + *T.cruzi* infection after 3 weeks of surgery and (III) SAH induction and *T.cruzi* infection at same time – experiment occurred during 8 weeks. For these sets of experiments, there was evaluation of physiological, parasitological, inflammatory and histological parameters in the plasma and/or cardiac tissue. After the 3<sup>rd</sup> week of the renovascular surgery, animals presented high pressoric levels in accordance with high plasma Angio II on the first weeks. However, there were not observed relation between the increase of SAH and the number of circulating parasites. In our data, *T. cruzi* exerted an important role in the production of TNF-alpha and CX3CL1/Fractalkine by host cells and we observed high plasma release of these mediators when associated with SAH, in distinct times of this study. On the other hand, SAH does not exerted influence on cardiac inflammatory infiltration neither in the amastigote proliferation, but contributed to the maintenance of the number of blood vessels after 8 weeks of the experiment in comparison with the reduction observed in the control group (without SAH). Together, these data suggest that the time of *T.cruzi* infection and the time of SAH development interfere, mutually, in the inflammatory profile induced by host mammalian. However, other studies performed in other *T.cruzi*-susceptible experimental model might develop cardiovascular lesions with high magnificence as well as inflammatory process in heart tissue during chronic stages of both diseases.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, systemic arterial hypertension (SAH), Angiotensin II, Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), Fractalkine (CX3CL1)

## **I - Introdução**

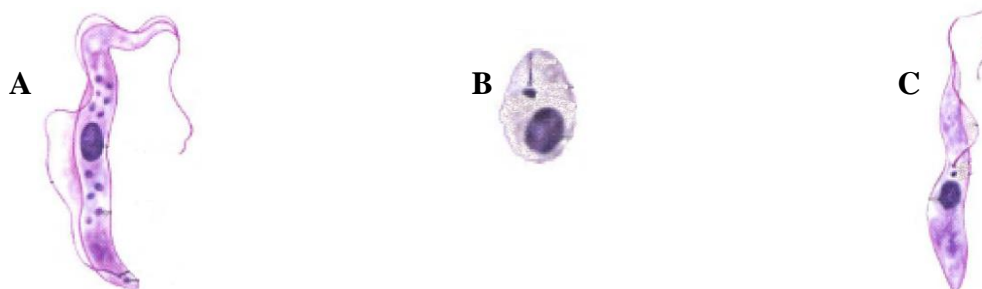
### **1.1 - O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas**

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas, como é popularmente conhecida, é uma importante antroponose que acompanha a espécie humana e outras espécies de mamíferos desde a antiguidade e é hoje uma das mais sérias doenças parasitárias do Brasil. Possui um alto impacto social, econômico e cultural, por ser uma doença crônica, incapacitante e debilitante (WHO, 2002) e está diretamente relacionado à pobreza. Estima-se que tenha cerca de 10 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (WHO, 2010). A doença de Chagas está presente do sul dos Estados Unidos da América ao sul da Argentina (WHO, 2008). No Brasil a maior prevalência de endemia chagásica está no estado de Minas Gerais, coincidindo com o local de sua descoberta (Dias *et al*, 2007).

Apesar do Brasil ter recebido em 2006 a certificação de país livre da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, a epidemiologia da doença de Chagas apresenta obstáculos para o controle efetivo da doença. O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado que possui cinetoplasto, pertencendo portanto à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae. O mesmo possui o ciclo de vida alternado entre hospedeiros invertebrados e vertebrados. Este parasita infecta 150 espécies de 24 famílias de mamíferos domésticos e selvagens, incluindo o homem (WHO, 2003). O hospedeiro invertebrado é o inseto hematófago conhecido popularmente como barbeiro ou chupança e pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Os gêneros de maior importância na transmissão da doença de Chagas humana são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Silveira *et al.*, 1984, Rebêlo *et al*, 1998). Além de um enorme número de animais silvestres infectados, outras espécies de triatomíneos também podem se tornar vetores em potencial, ao passo que o ser humano ocupa áreas cada vez maiores, aumentando assim as chances de infecção.

O ciclo de vida do *T. cruzi* é bastante complexo e envolve formas evolutivas diferentes que apresentam características morfológicas, bioquímicas e funcionais distintas (Brener, 1973; De Souza, 1984, Tyler e Engman, 2001). As mudanças de formas acontecem ao longo do ciclo de vida do parasito e é uma forma de adaptação ao novo ambiente em que ele se encontra. A principal diferenciação destas formas é quanto à posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Três formas do parasito são essencialmente

estudadas: tripomastigotas (Figura 1A) amastigotas (Figura 1B), epimastigotas (Figura 1C).



**Figura 1: Morfologia do *Trypanosoma cruzi*: A)** Tripomastigota, forma infectante encontrada nos hospedeiros vertebrado invertebrados; **B)** amastigota, forma replicativa no hospedeiro vertebrado; **C)** Epimastigota, forma replicativa no hospedeiro invertebrado. As ilustrações não se encontram nas proporções corretas.

A forma epimastigota é a forma proliferativa do parasito encontrada no intestino do triatoma. E a forma amastigota é a forma replicativa encontrada intracelularmente no hospedeiro vertebrado, são os chamados ninhos de amastigotas.

As formas tripomastigotas são as mais infectantes e são encontradas em ambos os hospedeiros, tripomastigotas metacíclicas no hospedeiro invertebrado e tripomastigotas sanguíneas no hospedeiro vertebrado. As formas tripomastigotas sanguíneas podem ser encontradas nas formas: delgada, larga e muito larga (Brener, 1965). Essas formas podem ter influência no desenvolvimento da doença, visto que foi demonstrado que formas delgadas penetram mais rapidamente nas células do hospedeiro sendo mais susceptíveis aos mecanismos imunes do hospedeiro, enquanto que as formas largas persistem por mais tempo no sangue periférico, sendo por tanto mais resistentes aos fatores imunológicos do hospedeiro (Brener, 1969, Brener 1977e Gomes 2003).

O *T.cruzi* pode ser transmitido ao hospedeiro vertebrado por vários mecanismos, sendo que a transmissão vetorial ainda representa o de maior importância epidemiológica. Porém a infecção pode ser adquirida também por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, via oral, transmissão congênita e acidentes de laboratório (Dias & Brener, 1984; Brener 1984; Dias 1992; WHO, 2002; Dias *et al.*, 2008, Dias, 2009 e Nobrega *et al.*, 2009).

Na transmissão vetorial, ocorre a deposição de formas tripomastigotas metacíclicas pelo barbeiro através da urina e fezes no momento do repasto sanguíneo. Estas formas penetram na pele lesada ou na mucosa, infectando qualquer célula nucleada (Brener, 1987). Os tripomastigotas desenvolveram complexos mecanismos de invasão celular que envolvem diferentes tipos celulares e interação com moléculas na superfície dessas células, eventos enzimáticos, sinalização celular mediada por cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), alterações na membrana, no citoesqueleto e nas organelas que permitem a formação de um vacúolo parasitóforo contendo o parasito no interior da célula hospedeira. (Epting *et al.*, 2010). Para a interação parasito-célula hospedeira ocorre o reconhecimento entre moléculas presentes na superfície de ambas as células. Após a adesão celular, ocorrem modificações nas membranas do parasito e da célula hospedeira envolvendo ligante-receptor e atividade proteolítica. O parasito entra por depressões da membrana formando uma vesícula parasitófora num processo dependente de lisossomos. Esse processo é altamente complexo e envolve várias proteínas de membrana do parasito, como a gp82, gp35/50, oligopeptidase B e cruzipaina (Yoshida, 2006; Yoshida, 2008). Após a fusão dos lisossomos à vesícula parasitófora, (fagolisossomo), por influência do pH ácido, os tripomastigotas no citoplasma se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. Quando a célula tem seu citoplasma repleto de amastigotas estas se transformam em tripomastigotas, que após o rompimento da célula hospedeira podem infectar outras células adjacentes ou cair na corrente sanguínea, infectando tecidos mais distantes e iniciando um novo ciclo (Burleigh & Woosley, 2002; Yoshida, 2006). As formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea podem, ainda, ser ingeridas pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo, estas se transformam na forma replicativa, o epimastigota, e posteriormente em tripomastigotas metacíclicas fechando assim o ciclo biológico do parasito (Brener, 1973; De Souza, 1984).

A história natural da doença de Chagas é constituída por uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença de níveis geralmente elevados de parasitismo sanguíneo, sendo o parasito facilmente detectado pelo exame de sangue a fresco. Esta fase da doença é caracterizada por sinais e sintomas quase sempre inespecíficos (Penna *et al.*, 2005), mas geralmente assintomática ou oligossintomática, o qual inclui sintomas não específicos, como: febre, mal estar, mialgia, calafrios, náusea, vômitos, diarreia e enfartamento ganglionar, o que dificulta o diagnóstico precoce da infecção. Alguns sintomas são patognomônicos, como os sinais de porta de entrada do

parasito, o sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação, além de outros sintomas como a hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite (Dias *et al.*, 1956). Nesta fase da doença ocorre aproximadamente 5% de mortalidade, que geralmente é resultante da infecção em crianças menores de dois anos, em decorrência de miocardite e meningoencefalite (Barrett *et al.*, 2003).

Na maioria dos casos os sintomas desaparecem espontaneamente, sendo observada a redução da miocardite (Brener, 1987). O parasitismo intenso, característico da fase aguda é controlado pela resposta imune contra o *T. cruzi*, estabelecendo uma infecção crônica com baixa parasitemia. Caso o indivíduo não receba tratamento adequado, este pode entrar em uma fase latente ou indeterminada, na qual as pessoas infectadas evoluem para um estado de aparente equilíbrio parasito-hospedeiro, sem manifestações clínicas e alterações patológicas comuns à cronicidade da doença ou mesmo vir a desenvolver problemas cardíacos e/ou digestivos. Mesmo pessoas que apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas podem passar a apresentar, ou não, as alterações cardíacos e/ou digestivos. (Rocha *et al*, 2007).

### **1.1.1 - Doença de Chagas e a inflamação**

A resposta inflamatória inicial à infecção pelo *T. cruzi* é coordenada por células do sistema mononuclear fagocitário que respondem aos antígenos do parasito através da via dependente de receptores do tipo *Toll* (TLR)-Myd88 (Campos *et al*, 2004). O reconhecimento das moléculas de superfície estimula a síntese de quimiocinas e citocinas pró inflamatórias pelos macrófagos do hospedeiro. As citocinas produzidas durante a infecção como o TNF-  $\alpha$ , IL-12, IL-1, INF-  $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ , são capazes de induzir e regular a produção de citocinas e quimiocinas, polarizando as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> em produtoras de IFN- $\gamma$  (Teixeira *et al*, 2002 Campos *et al*, 2004). Estas citocinas induzem a morte do parasito pela liberação de oxido nítrico (NO) pelos cardiomiócitos e macrófagos, através da enzima oxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Aliberti *et al*, 1999). A eficiência da resposta imune gerada contra o parasito na fase aguda da infecção pode gerar uma resposta moderada ou grave, na qual no primeiro caso é responsável pela redução, porém não pela eliminação do parasito, conferindo uma resistência parcial ao hospedeiro (Krettli & Lima Pereira, 1981) e no segundo caso, poderá ocasionar falência funcional do órgão (sítio inflamatório) ou mesmo morte do hospedeiro.

Em estudos utilizando modelos experimentais infectados por diferentes cepas do *T. cruzi*, foi determinado o papel de inúmeros mediadores inflamatórios potencialmente capazes de promover proteção contra o parasito, mas também desencadear uma resposta inflamatória condutora do processo de remodelamento cardíaco nesses animais (Guedes *et al*, 2010; Paula Costa *et al*, 2010; Melo *et al*, 2011). Dados da literatura demonstram que citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção, no entanto, são produzidas também em níveis elevados na fase crônica da doença, possivelmente pela exposição crônica ao parasita (Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003).

Citocinas e quimiocinas são importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estimular ou inibir a resposta imune (Sher *et al*, 1992, O'Garra *et al*, 1994). Esta resposta inflamatória produzida pelo hospedeiro vertebrado é essencial para sua resistência, no entanto, esta também é responsável por diversas patologias causadas ao longo da doença.

Os mecanismos pelos quais a replicação do parasita é controlada durante a fase aguda da infecção não estão totalmente compreendidos, mas estudos com modelos experimentais indicam o papel crucial de algumas citocinas (como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2) na resistência ao *T. cruzi* (Tanowitz *et al*, 1992). O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida tanto por células da imunidade inata quanto da adquirida. Possui amplo espectro de funções, mas destaca-se seu envolvimento no processo inflamatório no qual promove o recrutamento e ativação de fagócitos. O TNF- $\alpha$  tem um importante papel no controle da infecção murina pelo *T. cruzi*, ativando os macrófagos à destruir intracelularmente o parasita. Por outro lado, estudos mostraram que tanto na fase aguda quanto na fase crônica os níveis séricos de TNF- $\alpha$  foram relacionados à evolução da doença e à gravidade da cardiopatia chagásica por Ferreira (2003) e Talvani (2004), sugerindo a participação de TNF- $\alpha$  na formação da inflamação crônica e na lesão.

Embora os fatores que determinam os resultados clínicos, tanto em humanos quanto experimentalmente, são em parte, uma característica do parasita, é a natureza do hospedeiro e sua constituição genética e estado imune que são determinantes. Sabe-se também, que o padrão de produção de citocinas determina o resultado da infecção pelo parasita (Galvão da Silva *et al*, 2003; Silva *et al*, 1995; Torrico *et al*, 1991).



Sabendo que a doença de Chagas pode apresentar acentuadas lesões inflamatórias tanto na fase aguda quanto na crônica, podendo inclusive culminar em alterações morfológicas e funcionais do órgão afetado, escolheu-se estudar a interação desta doença com outra doença inflamatória vascular, como é o caso da hipertensão

## 1.2 – Hipertensão arterial sistêmica

As doenças do coração e dos vasos constituem no Brasil a primeira causa de morte segundo dados do Ministério da Saúde (2007), e doenças hipertensivas está em 8º lugar neste ranking. Tem sido desde a década de 1960 mais comum que as doenças infecciosas e parasitárias e tem recebido uma atenção especial por apresentar alta prevalência na população adulta em plena fase produtiva e por ter forte relação de risco com eventos cardiovasculares e cerebrovasculares, além de associar-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, como o coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos (Manual de Orientação Clínica: Hipertensão Arterial Sistêmica -HAS, 2011).

A hipertensão arterial em humanos, é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial, sendo uma doença definida pela persistência de pressão arterial sistólica acima de 135mmHg e diastólica acima de 85mmHg. Embora tenha enorme importância clínica, uma vez que, cronicamente a pressão elevada acarreta danos ao coração, vasos sanguíneos e rins, pelo menos nos estágios iniciais da hipertensão, não causa alterações evidentes na função cardiovascular (Campagnole-Santos & Haibara, 2001). É fator de risco para insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência renal crônica, aneurisma de aorta e retinopatia hipertensiva. Quando associada a outros fatores de risco como diabetes mellitus, obesidade, sedentarismo e tabagismo, os níveis pressóricos podem ser ainda mais elevados e as conseqüentes lesões de órgãos-alvo ainda mais graves (Manual de Orientação Clínica: Hipertensão Arterial Sistêmica -HAS, 2011)

Como mecanismo compensatório em resposta à sobrecarga cardíaca, o ventrículo esquerdo torna-se hipertrofiado, podendo ocasionar o desenvolvimento de arritmias com conseqüente morte súbita (Koren *et al*, 1991; Olivetti *et al*, 2000). A maioria das alterações cardiovasculares provocadas pela hipertensão é desencadeada por mecanismos compensatórios provocados diretamente pela pressão alta, como a

hipertrofia ventricular e vascular, ou indiretamente, devido ao dano vascular causado como a aterosclerose e nefrosclerose (Campagnole-Santos e Haibara, 2001).

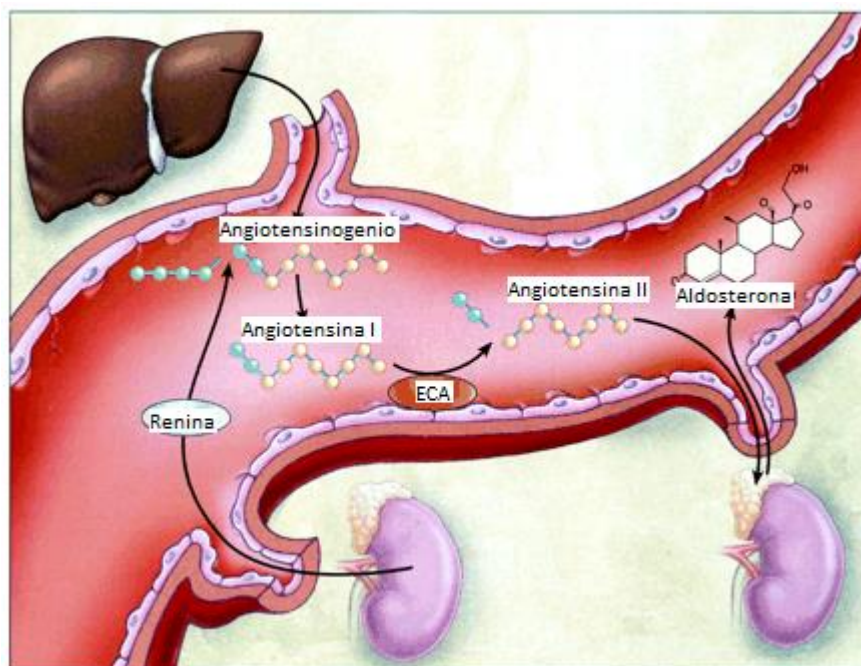
Por tratar-se de uma patologia oligossintomática e às vezes assintomática, acaba sendo de difícil diagnóstico, que muitas vezes ocorre de forma tardia. A hipertensão arterial é responsável por 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% das mortes por doença coronariana, sendo que esta porcentagem aumenta proporcionalmente aos valores pressóricos (Manual de Orientação Clínica: Hipertensão Arterial Sistêmica -HAS, 2011).

A regulação da pressão arterial é uma das funções fisiológicas mais complexas, que depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino (Guyton, 1985, Campagnole-Santos e Haibara, 2001). Diferentes mecanismos de controle estão envolvidos não só na manutenção, como na variação momento a momento da pressão arterial, e estes mecanismos regulam o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco (Irigoyen *et al*, 2001). A regulação efetiva da pressão arterial é o resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam a curto e longo prazo. O principal mecanismo de controle a curto prazo é desempenhado pelos reflexos que são originados nos pressorreceptores arteriais e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar (Campagnole-Santos & Haibara, 2001) e em longo prazo, este controle pode ser realizado através de fatores humorais. O sistema de controle a longo prazo mais amplamente estudado é o Sistema Renina Angiotensina.

### **1.2.1 - Sistema renina angiotensina**

O sistema renina-angiotensina é o maior regulador da pressão arterial agindo periféricamente e centralmente. Em sua definição clássica, o sistema renina-angiotensina mantém a pressão arterial por meio da Angiotensina II, gerada na circulação em uma cascata enzimática iniciada pela diminuição da pressão arterial que estimula a síntese de renina pelas células justaglomerulares do rim e sua liberação na corrente sanguínea. No sangue, a renina cliva o angiotensinogênio produzido no fígado, gerando o decapeptídeo inativo Angiotensina I (Ang I) que, principalmente nos pulmões, dão origem à

Angiotensina II (Ang II) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Guyton & Hall, 2002). Veja a Figura 2 que representa esquematicamente esta cascata.



*Adaptado de: New England Journal of Medicine (2001; 345:1690)*

**Figura 2: Representação da cascata do Sistema Renina-Angiotensina:** O angiotensinogênio (14 aminoácidos) é sintetizado pelo fígado. Na circulação sanguínea ele é clivado pela renina formando a Angiotensina I (10 aminoácidos). Este, por sua vez é clivado pela Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) formando a Angiotensina II. Nas glândulas adrenais, a Angiotensina II estimula a formação de aldosterona que sinaliza ao rim a necessidade de diminuir a liberação de renina, reter sais e assim aumentar a pressão arterial

Um aumento da Angiotensina II plasmática pode levar à diminuição da liberação de renina através da estimulação da liberação de aldosterona e vasopressina e do aumento da pressão arterial sistêmica, mecanismo chamado de retroalimentação negativa. A liberação de renina é dependente da concentração de sódio no plasma. Uma redução na concentração intracelular de sódio, ao nível da mácula densa, estimula a liberação de renina na circulação sistêmica.

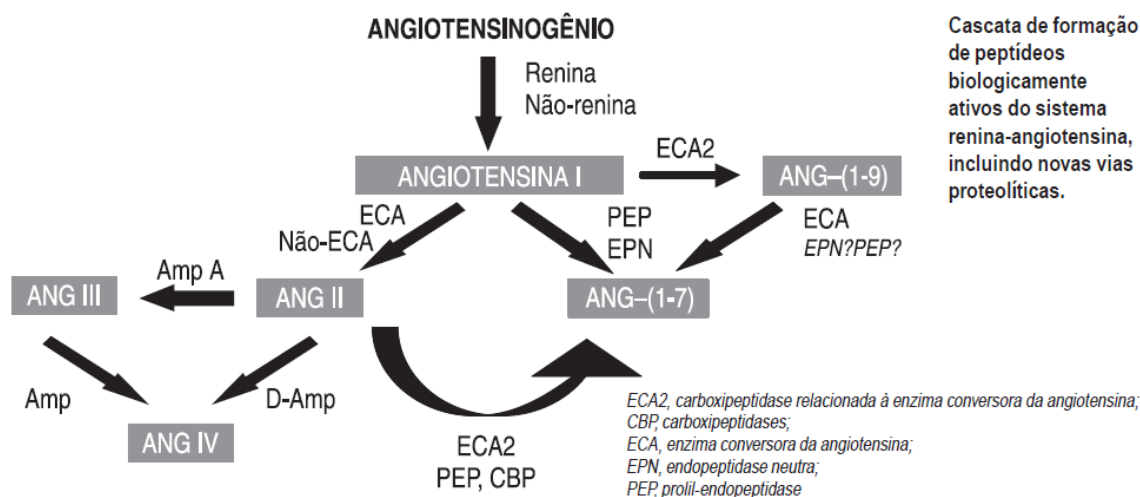
Na visão moderna o sistema renina-angiotensina é o principal agente regulador da pressão arterial basal sendo composto por peptídeos vasoativos com ações hipertensivas e anti-hipertensivas que agem de modo endócrino, parácrino e autócrino (Simões-e-Silva

*et al*, 1997; Santos *et al*, 2000). Este sistema está ligado ao surgimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão, doenças coronarianas, miocardites e insuficiência cardíaca (Dostal *et al*, 1999).

A Angiotensina II é um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos e é considerada, o principal componente desse sistema. Ela pode ser degradada à 3 subprodutos, são eles: Angiotensina III que é equipotente à Angiotensina II em sua interação com o receptor AT<sub>1</sub>, mas tem baixa eficácia *in vivo* devido ao seu metabolismo acelerado na circulação. O segundo produto metabólico é a Angiotensina IV, que segundo estudos, causa vasodilatação e natriurese (Handa *et. al.*, 2001). E o terceiro metabólito é a Angiotensina (1-7) que libera óxido nítrico e prostaglandinas que causam vasodilatação, inibem a proliferação celular muscular e a trombogênese, (Rajendran *et.al.*, 2005; Kucharewicz I. *et. al.*, 2002), atenuando o efeito vasoconstritor da Angiotensina II (Lemos *et. al.*, 2002; Clark *et. al.*, 2001) e inibindo a ECA (Deddish *et. al.*, 1998). Desequilíbrios na interação harmônica entre Ang II e Ang-(1-7) parecem contribuir para o início e desenvolvimento de doenças.

Os principais peptídeos ativos deste sistema são a Angiotensina-II e Angiotensina (1-7) (Ang(1,7)) que possuem na maioria das vezes efeitos antagônicos sobre a saúde vascular (Machado *et al*, 2000), podendo exercer papel fundamental no surgimento da hipertensão essencial (Benter *et al*, 1995), sendo a Ang II o responsável por promover ações hipertensivas nos diferentes sistemas fisiológicos.

A figura 3 demonstra simplificada esta via com os principais peptídeos biologicamente ativos no sistema renina angiotensina. No entanto, a Angiotensina II também pode ser formada por outras vias independentes da renina, pela ação de catepsinas e quimases (não demonstrado na figura 3).



Fonte: Santos, R.A.S. e Sampaio W.O., 2002

**Figura 3: Principais peptídeos biologicamente ativos do Sistema Renina Angiotensina:** Angiotensina I é um peptídeo inativo que ao ser clivado dará origem à dois peptídeos ativos e na maioria das vezes com efeito antagônicos: a Angiotensina II (AngII) que é um potente vasoconstritor, tendo portanto efeito hipertensivo e a Angiotensina (1-7) (Ang-(1-7)) que é vasodilatador. Amp A – aminopeptidase A; Amp – aminopeptidase; CBP – carboxipeptidase; D-Amp – Dipeptidil-aminopeptidase; PEP – Prolilendopeptidase; EPN – Endopeptidase neutra; ECA – Enzima conversora de angiotensina; ECA2 – Carboxipeptidase relacionada à enzima conversora de angiotensina.

A Angiotensina II atua principalmente através de dois subtipos de receptores, o AT<sub>1</sub> e o AT<sub>2</sub> (Batenburg et.al., 2004), sendo que os efeitos fisiológicos e patológicos mais conhecidos são mediados via receptores AT<sub>1</sub> acoplados a múltiplas interações com cascatas de transdução de sinal, comandando diversas ações biológicas (Zhong et. al., 2005), dentre elas os efeitos cardiovasculares que podem levar a hipertensão (Kusserow e Unger, 2004). O receptor AT<sub>1</sub> é encontrado predominantemente em adultos e são responsáveis pela maioria das ações fisiológicas clássicas da Angiotensina II nos sistemas cardiovascular e neuroendócrino, rins, fígado e outros tecidos (Zhuo et al. 1998; Ardaillou et al, 1999; De Gasparo et al, 2000).

A Ang II, pela sua ligação ao receptor AT<sub>1</sub>, induz a vasoconstrição vascular (principalmente renal, cerebral e coronariana), retenção renal de sódio e de água (via liberação de aldosterona e via liberação de vasopressina respectivamente), supressão da renina (por *feedback* negativo), hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos, estimulação de fibrose no miocárdio e vascular, efeito inotrópico positivo (aumento da força de contração do coração), ativação do sistema nervoso simpático (SNS), estimulação da

secreção endotelial e estimulação da formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) (Zhong *et al*, 2005).

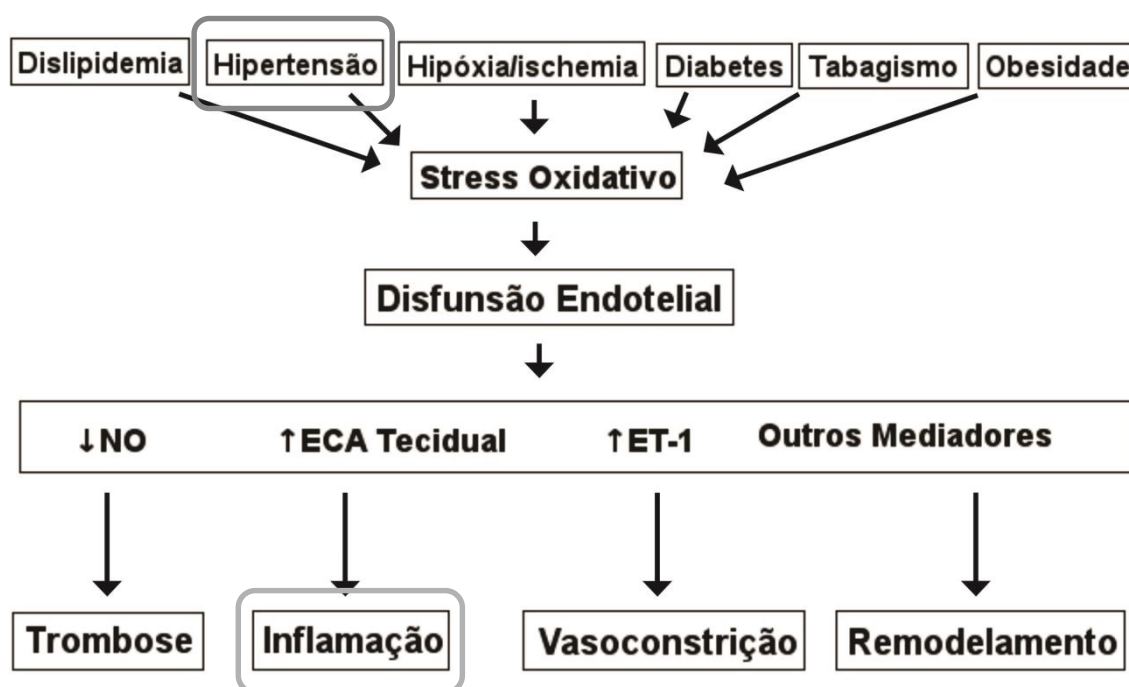
O receptor AT<sub>2</sub> tem uma alta expressão no período fetal e neonatal e decai com o envelhecimento. Os principais efeitos dos receptores AT<sub>2</sub> (inibição do crescimento celular e redução na pressão arterial, diferenciação celular, reparação tecidual, apoptose, vasodilatação, desenvolvimento dos rins e trato urinário e proteção contra isquemia cardíaca) parecem ser relativamente sutis e se opõem aos dos receptores AT<sub>1</sub>. (Batenburg *et al*, 2004).

### 1.2.2 - Hipertensão e a inflamação

Dados clínicos que liguem a hipertensão à inflamação são escassos, no entanto o suficiente para estabelecer a Proteína C Reativa como o marcador inflamatório vascular mais forte e reprodutível. Níveis elevados de Proteína C Reativa em indivíduos normotensos podem ser preditivo para o desenvolvimento de uma hipertensão futura, o que sugere que a inflamação possa até mesmo preceder o desenvolvimento da hipertensão (Boos & Lip, 2006; Li *et al*, 2007). O aumento da Proteína C Reativa estimula a liberação de outras citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por parte dos monócitos ativadas, bem como a expressão de ICAM-1 (*intracelular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*Vascular adhesion molecule-1*) pelas células endoteliais. Além disso, a Proteína C Reativa causa potente regulação à transcrição de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) nas células endoteliais e desestabiliza a função do RNAm da eNOS. Tendo por resultado a redução na liberação de NO basal (NO constitutivo) e estimulado (NO induzível) pelo endotélio que parece ser o passo crítico para o desenvolvimento de hipertensão arterial e aterosclerose, com seus consequentes eventos vasculares. O aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) além de ter importante papel na inativação do NO, também aumentam a expressão gênica de agentes pró-inflamatórios. Há que se lembrar da atividade pró inflamatória e proliferativa da Angiotensina II com a ativação do sistema renina angiotensina-aldosterona. De fato, estudos clínicos demonstraram que a redução da formação/atividade de Angiotensina II, tanto por inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) ou bloqueio de receptores de Angiotensina II significativamente melhora a função endotelial e diminui a microinflamação vascular (TNF- $\alpha$ ; IL-6 e Proteína C Reativa) em pacientes com

hipertensão arterial (Melo *et al*, 2007). O aumento de moléculas inflamatórias está envolvido na regulação do tônus vascular, por exemplo, níveis circulantes de Proteína C Reativa, IL-6 e TNF- $\alpha$  estão positivamente relacionados com rigidez aórtica em pacientes com hipertensão essencial (Li *et al*, 2007).

A hipertensão, assim como outros fatores de risco, contribui para o estresse oxidativo levando a uma disfunção endotelial que acarreta na diminuição do óxido nítrico (um importante vasodilatador) e elevação dos níveis da ECA (aumentando assim os níveis de Angiotensina II) e da Endotelina 1, que é vasoconstritora. Estes eventos intensificam os eventos inflamatórios (Figura 4).



*Adaptado de: Schiffrin, 2002*

**Figura 4: Inflamação na Hipertensão:** A hipertensão, assim como outros fatores de risco, contribui para o estresse oxidativo levando a uma disfunção endotelial que acarreta na diminuição do óxido nítrico (um importante vasodilatador) e elevação dos níveis da ECA (aumentando assim os níveis de Angiotensina II) e da Endotelina 1, que é vasoconstritora. Estes eventos intensificam os eventos inflamatórios. (O destaque da figura evidencia a hipertensão como um precursor da inflamação)

De nove estudos feitos sobre a associação entre o aumento do TNF- $\alpha$  e a hipertensão, sete relataram uma associação positiva. O mecanismo preciso pelo qual o TNF- $\alpha$  influencia na hipertensão não é certa, mas o TNF- $\alpha$  reduz os níveis de RNAm de eNOS e conseqüentemente a biodisponibilidade de NO (Boos & Lip, 2006).

A hipertensão está associada com alterações estruturais da resistência arterial, um processo conhecido como remodelamento. No nível celular, o remodelamento vascular envolve mudanças no crescimento de células do músculo liso, migração celular, inflamação e fibrose, contribuindo para a hipertrofia vascular característica da hipertensão arterial (Kasal & Neves, 2011). Todos estes processos são mediados por vários fatores, dos quais a Angiotensina II parece ser um dos mais importantes na hipertensão. Estudos experimentais revelaram que a Angiotensina II possui várias propriedades pró-inflamatórias, como por exemplo, a *up-regulation* do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) nas paredes aórticas, levando à infiltração de monócitos e ao remodelamento vascular. A Angiotensina II pode também diminuir a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e aumentar a produção de mediadores pró-inflamatórios. Os monócitos humanos possuem receptores para a Angiotensina II, podendo ser ativado por ela (Boos & Lip, 2006).

### 1.2.3 - O modelo 2 rins-1clip

A hipertensão arterial pode ser estudada através de vários modelos experimentais. Entre os mais estudados estão os animais espontaneamente hipertensos (SHR) (modelo mais utilizado, mas que representa um tipo raro de hipertensão primária humana herdada de modo mendeliano) e cirurgicamente através da estenose da artéria renal (estreitamento da artéria renal diminuindo o fluxo sanguíneo até o rim), perinefrite (inflamação do tecido celular que circunda o rim), compressão renal ou coarctação da aorta (estreitamento da principal artéria do corpo com consequente hipertensão nos braços, cabeça e hipotensão na parte inferior do corpo) nos animais com um ou dois rins (Brody *et al*, 1991)

O modelo de hipertensão renal utilizada neste projeto foi produzido primeiramente por Harry Goldblatt e colaboradores em 1934, através da constrição de uma artéria renal canina, enquanto o rim contralateral foi mantido intacto. Esta hipertensão é conhecida como hipertensão dois rins um clip (2R1C) de Goldblatt (Goldblatt *et al*, 1934). Em 1939, Wilson e Byrom adaptou o modelo, restringindo a artéria renal de ratos, possibilitando ter um modelo de hipertensão crônica, não possível em cães, além de ocupar menor espaço e custo, possibilitando um maior número de animais por experimento.

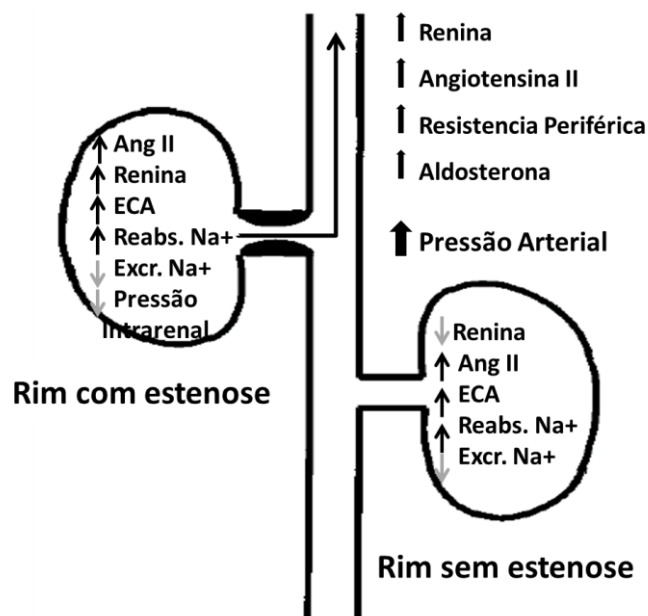


Neste modelo 2R1C, a aplicação de um clipe constritor em uma artéria renal acarreta na obstrução parcial da perfusão levando à redução do fluxo sanguíneo renal, redução da taxa de filtração glomerular e aumento na secreção de renina no rim isquemiado (Martinez-Maldonado, 1991). Deste modo, o rim em constrição retém água e sal. O rim clipado sofre uma atrofia devido à estenose provocada, enquanto que o rim contralateral sofre uma hipertrofia compensatória (Sigmon & Beierwaltes, 1993).

O Sistema Renina Angiotensina-Aldosterona é o responsável pela fase inicial nesse tipo de hipertensão (Unger e cols., 1998; Brody e cols., 1991). A renina cliva o Angiotensinogênio formando Angiotensina I e a enzima conversora de angiotensina (ECA) atua na Angiotensina I produzindo Angiotensina II. O aumento da Angiotensina II na circulação culmina no aumento da aldosterona, da reabsorção de sódio, da resistência periférica, de fatores de crescimento e da pressão arterial. Neste modelo de hipertensão o aumento dos níveis de renina produzida pelo rim isquêmico também determina, no rim não-clipado, retenção de água e sal (Navar *et al*, 1998).

No modelo de Goldblatt 2R1C, a concentração de renina no rim cuja artéria está parcialmente ocluída, é de 3 a 4 vezes maior que o normal dentro de uma semana, enquanto no rim contralateral (não ocluído) os níveis de renina são quase indetectáveis. A redução da pressão de perfusão e do fluxo sanguíneo renal imposto pela constrição da artéria renal é, certamente, o estímulo para o aumento da produção de renina no rim isquêmico. O desenvolvimento da hipertensão, com conseqüente aumento da pressão de perfusão e do fluxo sanguíneo renal, bem como o aumento de renina circulante, explica a depleção de renina do rim normal (Navar e cols, 1998).

A representação esquemática do mecanismo angiotensina-dependente ativado pela estenose unilateral da artéria renal encontra-se na Figura 5.



*Adaptado de: Navar e cols., 1998*

**Figura 5: Mecanismo angiotensina-dependente ativado pela estenose unilateral da artéria renal:** a redução da pressão de perfusão e do fluxo sanguíneo renal imposto pela constrição da artéria renal induz uma hiperatividade do sistema renina angiotensina, aumentando a produção de renina e consequentemente de angiotensina no rim isquêmico. Paralelamente, o fluxo sanguíneo no rim não isquêmico é aumentado e ocorre a redução da produção de renina, confirmado pela diminuição do RNAm para renina. No entanto, por motivos ainda não elucidados, a produção de ang II neste rim tem sua produção aumentada. Essas alterações renais em conjunto, provocam aumento dos níveis de ANG II plasmáticos; com aumento da aldosterona, da resistência vascular periférica e consequentemente da pressão arterial.

A hipertensão arterial é uma doença progressiva e caracterizada por três fases (Martinez-Maldonado, 1991). Na fase I verifica-se aumento dos níveis de renina e Angiotensina II circulantes, aumento da expressão de receptores para Angiotensina II e constante aumento da pressão para níveis hipertensivos. Na fase II os altos níveis de atividade da renina plasmática começam a declinar, a sensibilidade dos vasos à Angiotensina II está aumentada e a pressão sanguínea permanece estável a níveis hipertensivos ou pode continuar a aumentar. A fase III conhecida como fase crônica, caracteriza-se pela hipertensão arterial decorrente de outros fatores causais além da Angiotensina II.

### 1.3 – Hipertensão arterial sistêmica na doença de Chagas

A doença de Chagas e a hipertensão arterial sistêmica são patologias prevalentes na América Latina e ambas interligadas por serem conseqüentes às disfunções autonômicas cardíacas.

Esta associação é alvo de discórdia na literatura científica, visto que Guariento *e colaboradores* (1993) e Palmero *e colaboradores* (1985) descreveram uma elevada prevalência da hipertensão entre indivíduos chagásicos quando comparada com o grupo de indivíduos não infectados na população de estudo, sendo esta observada principalmente após a quarta década de vida. Por outro lado, Palmero *e colaboradores* (1980) descreveram em um inquérito populacional que a hipertensão apresentou baixa frequência em pacientes chagásicos crônicos, quando comparado com o restante da população. Em modelo experimental, foi descrito uma redução dos níveis tensionais em ratos hipertensos após a infecção pelo *T. cruzi* (Dias da Silva *et al.* 1999).

Andrade & Andrade (1966, 1968) estudaram o sistema nervoso autônomo na doença de Chagas em animais de laboratório e concluíram que ambos os sistemas, simpático e parassimpático são afetados, com uma distribuição esparsa e quantitativamente não homogênea, que podem explicar a discrepância de resultados de hipertensão ou hipotensão em pacientes chagásicos. Ainda que o mecanismo não tenha sido totalmente elucidado, existem fortes evidências de que fenômenos auto-imunes estejam implicados na mediação da lesão neuronal na fase crônica da doença de Chagas (Ribeiro dos Santos & Hudson, 1980; Gea *et al.*, 1993). Tal disfunção autonômica pode contribuir para o aparecimento de arritmias graves, potencializar ou controlar a HAS nos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* ou mesmo levá-los à morte súbita.

Nos indivíduos portadores da cardiopatia chagásica, a presença do *T. cruzi* associado aos eventos inflamatórios e conseqüente distúrbio neuro-endócrino os conduzem a um quadro arritmogênico severo e a alterações vasculares significativas (ex. tromboembolismo) conduzindo estes indivíduos à incapacidade laborativa ou mesmo ao óbito.

A avaliação dos danos causados aos órgãos-alvos em indivíduos hipertensos tem sido extremamente explorada pelos investigadores clínicos. A presença destes danos, particularmente a hipertrofia ventricular esquerda, aumenta substancialmente o risco de

eventos cardiovasculares secundários ao aumento da pressão arterial sistêmica, caracterizada pelo aumento da Angiotensina II. Porém, no miocárdio, a Angiotensina II e o excesso de aldosterona podem, em conjunto, apresentar mecanismos deletérios como a promoção da hipertrofia e fibrose (Rossi, 2006).

A associação entre a expressão elevada de Angiotensina II plasmática/tecidual em indivíduos hipertensos e chagásicos (co-morbididades importantes em áreas endêmicas para a doença de Chagas) poderia interferir diretamente no processo inflamatório gerado pela infecção pelo *T. cruzi* e contribuir para um prognóstico desfavorável para a doença. Mediante os efeitos deletérios da doença de Chagas com a HAS (Kaplan, 2001), surge o questionamento se tais alterações vasculares não estariam afetando negativamente o prognóstico clínico da doença de Chagas. Sabe-se, por exemplo, que nas regiões em que a moléstia de Chagas é endêmica, episódios de tromboembolismo são de grande relevância clínica, sendo importante lembrar que a cardiopatia chagásica já foi inclusive qualificada como “cardiomiopatia embolígena” (Castagnino, 1978). Este fato é relevante, tendo em vista o número elevado de indivíduos chagásicos apresentando concomitantemente HAS (Guariento *et al.*, 1993; Palmero *et al.*, 1985) e as dificuldades envolvidas na prevenção e tratamento dos fenômenos vasculares sistêmicos em diferentes grupos populacionais (Wright, 1974; Elliot *et al.* 1980).

A proposta de um modelo experimental que pudesse mimetizar, em parte, alguns destes parâmetros inflamatórios e fisiológicos seria de grande utilidade para a pesquisa básica desta doença parasitária. Além disso, uma melhor compreensão dos mecanismos de função autonômica cardiovascular e imunopatológicos associados à HAS e à infecção pelo *T. cruzi*, mesmo que demonstradas em um modelo experimental, possibilitaria estudos clínicos futuros para uma conduta diferenciada dos pacientes chagásicos e hipertensos.

Apesar da importância e elevada prevalência destas duas patologias na população latino-americana, poucos estudos em humanos ou modelos experimentais apontam para as reais alterações fisiopatológicas secundárias à associação da doença de Chagas e a HAS, principalmente pelo marcante efeito inflamatório atualmente atribuído à Angiotensina. Por este motivo resolvemos estudar as alterações fisiopatológicas que ocorrem com a interação da hipertensão e infecção pelo *T. cruzi* experimentalmente.

## 2 - Objetivos

### 2.1 - Objetivo Geral

Avaliar a resposta inflamatória cardiovascular em modelo de hipertensão induzida (2R1C) em ratos na fase aguda e crônica recente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 - Objetivos Específicos

1. Avaliar indiretamente os níveis pressóricos durante o desenvolvimento da hipertensão renovascular 2R1C;
2. Quantificar os níveis plasmáticos de Angiotensina II durante o desenvolvimento da hipertensão;
3. Avaliar a parasitemia e a mortalidade dos animais com hipertensão (2R1C) durante a fase aguda e/ou crônica da doença de Chagas;
4. Avaliar os aspectos macroscópicos e histomorfológicos do coração nas diversas situações;
5. Avaliar o índice de infiltrado inflamatório, de parasitos teciduais e as alterações dos vasos adjacentes ao coração
6. Avaliar os níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios: TNF- $\alpha$  e CX3CL1/Fractalkine nas diversas situações.

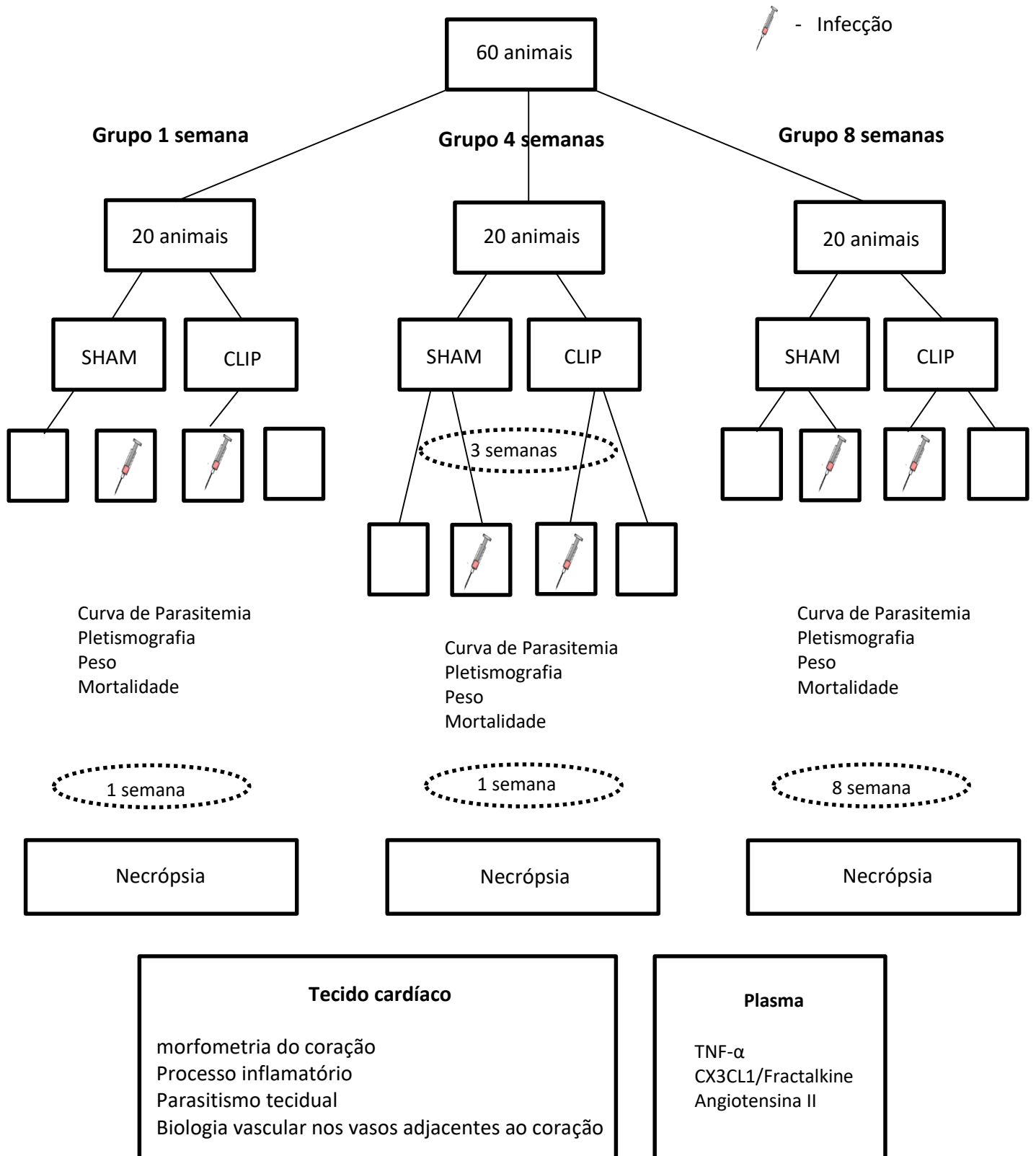
### 3 - Materiais e Métodos

#### 3.1 - Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos, com peso variando entre 180 a 200 gramas (aproximadamente 2,5 meses), fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (biotério) da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram alojados em gaiolas de 41 X 34 X 16 com 5 animais cada e mantidos no biotério com ciclos controlados de 12 horas de luz/escuro com ração padrão (nuvital) e água *ad libitum* durante todos os experimentos. Foram utilizados 60 animais no total divididos em três experimentos diferentes (7 dias de infecção pós cirurgia; 4 semanas de cirurgia/7 dias de infecção e 8 semanas de infecção pós cirurgia). Cada experimentos é subdividido em 4 grupos, sendo eles: Sham não infectado (n=5, ratos normotensos); Sham infectados (n=5, ratos normotensos infectados com 1,2 milhão de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*); Clipados não infectado (n=5, ratos hipertensos) e Clipados infectados (n=5, ratos hipertensos infectados com 1,2 milhão de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*).

Todos os experimentos e protocolos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (aprovação número 2011/44)

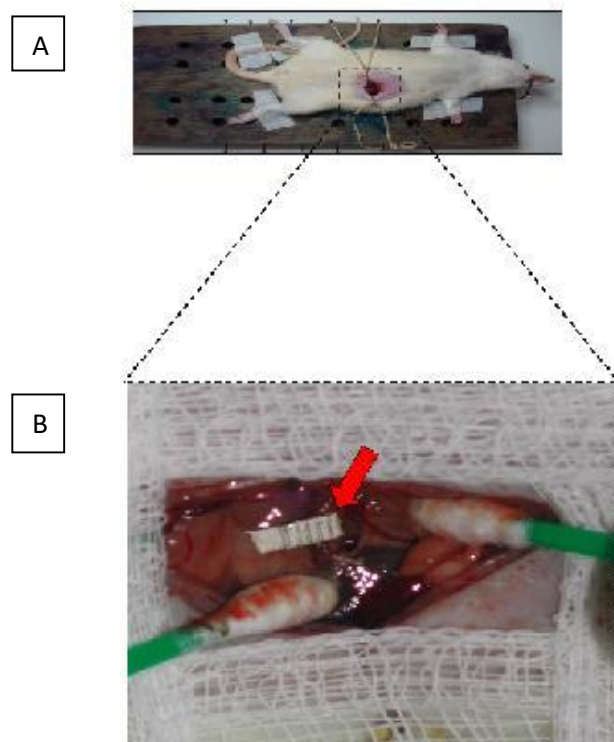
3.2 - Delineamento Experimental



### 3.3 - Cirurgia renovascular

Para a produção da hipertensão arterial foi utilizado o método descrito por GOLDBLATT e cols., em 1934, denominado 2 rins 1 clip (2R1C). Os ratos de aproximadamente 180-200g foram submetidos a jejum de 24 horas, com livre acesso à água. No dia da cirurgia, sob anestesia via intraperitoneal (i.p.) produzida pela solução de ketamina [0,1 mL/100 gramas de peso, intramuscular (i.m.), (Vetbrands, São Paulo, Brasil)] e Xilazina [0,02 mL/100 gramas de peso, via i.m.; (Agener União, São Paulo, Brasil)]. Os animais foram colocados em decúbito dorsal em uma prancha cirúrgica, e submetidos à tricotomia e assepsia da região abdominal com álcool iodado a 2%. Os animais foram submetidos a uma incisão lombar retroperitoneal e colocados retratores bilaterais na incisão cirúrgica. O afastamento das vísceras foi realizado com a ajuda de cotonetes embebidos em solução fisiológica. A veia renal foi identificada e a artéria renal cuidadosamente separada da mesma. Um clip de prata 950 (contendo 5% de liga de cobre e ótimo grau de dureza) apresentando 8mm de comprimento e 2 mm de largura, em forma de "U", cuja abertura havia sido previamente fixada através do uso de um calibrador, foi colocado ao redor da artéria renal. O grau de constrição do clip escolhido foi de 0,20mm de diâmetro interno, de acordo com BRITTO e cols., 1997, que mostrou que este grau de constrição proporcionava maior sucesso na obtenção de PA>130mmHg (pressão escolhida para selecionar o animal hipertenso). A figura 6 ilustra o momento de implantação do clip.





**Figura 6: Foto do momento da cirurgia renovascular:** Animal anestesiado em decúbito dorsal, após jejum de 24horas, com o (seta vermelha da Figura B:) clip de prata de 0,2 mm em sua artéria renal para a indução da hipertensão arterial conforme Goldblatt (1934). Outro grupo de animais foi submetido à cirurgia fictícia (Sham), que consistiu na realização de todos os procedimentos acima, exceto pela colocação do clip de prata em torno da artéria renal. Estes animais, Sham, foram utilizados como controle (normotensos).

Todos os animais tiveram o músculo do seu abdômen suturado com pontos contínuos, e a pele com pontos isolados (para diminuir a chance do ponto soltar ou o animal retirar-os, podendo abrir a região lombar, e ter como consequência uma infecção ou até morte do animal). Como medida profilática, foi administrado após a cirurgia, 0,2mL de Pentabiótico veterinário (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil).

### **3.4 - Padronização da concentração de parasitos e infecção com o *Trypanosoma cruzi***

Devido à comprovada resistência do rato adulto, em contraste com uma maior susceptibilidade do animal jovem, foi estabelecida uma curva com diferentes concentrações do parasito. Alguns autores descreveram diferentes inóculos do *T. cruzi* em linhagens distintas de ratos (Silva & Nussenzweig, 1953; Martinelli, 2006;;Rachid, 2006, Dhiman, 2008). Em nosso estudo avaliamos as curvas de parasitemia de 9 animais

sendo, 3 inoculados com  $3 \times 10^5$ , 3 inoculados com  $6 \times 10^5$  e 3 com  $1,2 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. O inóculo de  $1,2 \times 10^6$  formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foi escolhido com base na análise de uma parasitemia mais evidente, mas sem afetar a sobrevivência dos animais.

Logo após a cirurgia e com os animais ainda sob efeito do anestésico, animais CLIP ou SHAM, dos grupos experimentais de 1 semana e 8 semanas, receberam intraperitonealmente (i.p) o inóculo de  $1,2 \times 10^6$  tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, (isolados de camundongos Swiss no pico de parasitemia, que ocorreu no sétimo dia de infecção). O grupo experimental de 4 semanas teve a infecção apenas após 3 semanas de cirurgia (quando a hipertensão já estava estabelecida).

### 3.5 - Parasitemia

A contagem das formas sanguíneas do *T. cruzi* ocorreu em todos os animais, diariamente até o 20º dia ou até a eutanásia, o que correu antes. Foi retirado sangue da veia caudal do rato e a contagem dos parasitos foi feito pelo método descrito por BRENER (1962), que consiste em colocar uma alíquota de  $5 \mu\text{L}$  de sangue infectado em uma lâmina de microscópio cobrindo-a com uma lamínula  $22 \times 22 \text{mm}$ , determinando assim o número de parasitos em 50 campos. O número encontrado foi multiplicado pelo fator do microscópio calculado para a objetiva.

### 3.6 - Pletismografia Digital

Utilizou-se o pletismógrafo de cauda da marca Panlab modelo LE5001 (Laboratório de Hipertensão - NUPEB) para avaliação indireta da pressão arterial média e frequência cardíaca dos animais. Antes da cirurgia houve treinamento dos animais para que o nível de estresse no momento da leitura fosse amenizado. As leituras tiveram início em todos os animais na primeira semana após a cirurgia e ocorreram uma vez por semana pelo tempo determinado para experimento (1, 4 ou 8 semanas) quando, então, os animais foram eutanasiados.

Os animais eram colocados em um contensor e este era alocado sob um aquecedor cuja temperatura era controladamente alta, para que ocorra vasodilatação da artéria caudal

facilitando assim a mensuração. Era colocado na cauda do animal um manguito de borracha possuindo um sensor que descrevia as pressões e frequência cardíaca. Quando a pressão arterial média encontrava-se estabilizada, dava-se início à leitura e o manguito era inflado e desinflado automaticamente e os valores da pressão arterial média e da frequência cardíaca era mostrado no visor do aparelho. Este procedimento foi repetido 15 vezes e foi feito uma média para análise das variáveis por dia.

### 3.7 - Peso dos animais

Os animais foram pesados antes de cada cirurgia e semanalmente após cada experimento de pletismografia de cauda.

### 3.8 - Ensaio imunoenzimáticos - ELISAs

#### 3.8.1 - Fractalkine/CX3CL1; Fator de Necrose tumoral-alfa/TNF- $\alpha$ e Angiotensina II

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados utilizando-se soro de ratos wistars infectados ou não pelo *T. cruzi* e submetidos ou não a cirurgia renovascular. O sangue do animal foi coletado por punção cardíaca e centrifugado para correta separação do soro. Para o Procedimento do ensaio foram utilizados kits para a determinação de CX3CL1 (*R&D System, cat DY990*), TNF- $\alpha$  (*PeptoTech, 900-K54*) e Angio II (*USCN, E90005Ra*).

Em cada poço (placas de 96 poços) foram adicionados anticorpo monoclonal específicos para captura e a placa foi encubada em temperatura ambiente *overnight*. Os anticorpos não adsorvidos foram descartados por sucessivas lavagens em e as placas foram bloqueadas à temperatura ambiente. A seguir as placas foram novamente lavadas e as amostras de soro aplicadas. Paralelamente os estoques padrão das citocinas investigadas foram submetidas a diluições seriadas (1:2), conforme especificações dos fabricantes para a geração da curva padrão, e adicionadas aos poços. Após o tempo necessário as placas foram novamente lavadas e adicionadas anticorpo de detecção. Finalmente foi adicionada reagentes de coloração e após tempo de incubação em ausência de luz, a reação foi bloqueada (ou não, conforme exigência do fabricante) e as placas

foram levadas para leitura de intensidade de coloração realizada no leitor de ELISA (Microplate Reader, model 680, BioRad).

Para cada kit de ELISA realizado foram feitas adequações (tempo, concentração, reagentes e suas quantidade,) de acordo com as exigências de cada fabricante.

### **3.9 - Histopatologia**

#### **3.9.1 - Processamento Histológico**

Durante a eutanásia o coração foi removido e lavado em água destilada. Os corações foram fixados em solução formol a 10% em PBS, desidratados em soluções de álcoois etílicos em concentrações crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em 5µm, corados pela Hematoxilina por 1 minuto e 30 segundos e pela Eosina durante 40 segundos. Após isto foram mergulhados rapidamente 3 vezes em álcool absoluto e 3 vezes em água. Após o último processo as lâminas com cortes foram colocadas na estufa à 56°C para secagem. Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas e Etellan e submetidos à análise em microscopia óptica.

#### **3.9.2 - Análise morfológica qualitativa e quantitativa dos tecidos cardíacos**

Para contagem dos parasitos teciduais (ninhos de amastigotas), vasos e mensuração da inflamação, o tecido cardíaco foi processado e avaliado através da histologia convencional. Aspectos qualitativos e quantitativos dos tecidos foram analisados. Para quantificação dos parâmetros analisados no tecido, 30 imagens de cada coração foram obtidas com a objetiva de 40X através do software de captura de imagens Leica Application Suite do laboratório multiusuário do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas/UFOP. Posteriormente, as imagens foram avaliadas no computador pessoal com o programa ImageJ. Foi inserido virtualmente sobre a foto, uma grade com cerca de 99 interseções, nas quais foram classificadas em (1) vasos, (2) inflamação perivascular, (3) inflamação, (4) ninho, (5) outros elementos do tecido e (6) artefatos. Esta classificação ocorreu nas 30 fotos de 5 animais por grupo e no fim foi feito a média destas e comparada com outros grupos.

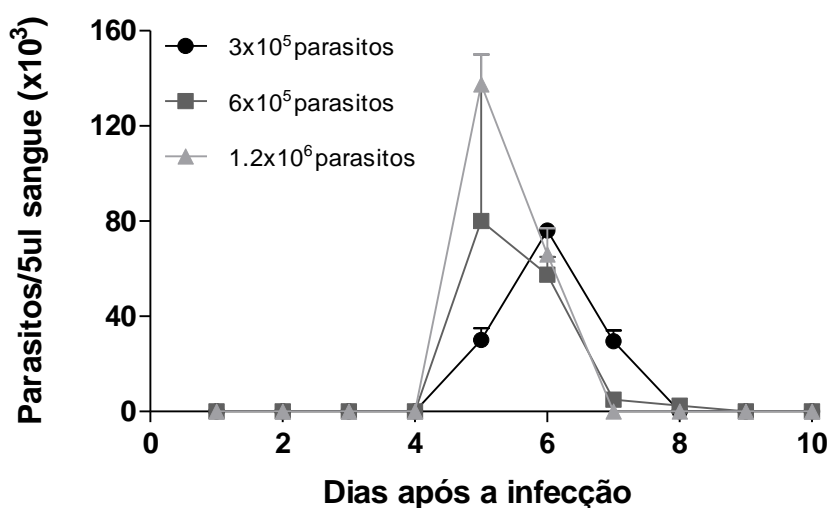
### **3.10- Análise Estatística**

Os parâmetros avaliados foram representados pela média de seus valores e respectivo erro médio padrão. Utilizou-se o programa *GraphPad Prism* (versão 5.00) e os dados foram analisados pelo teste OneWay ANOVA para múltiplas comparações (Bonferroni). As diferenças foram consideradas significativas se o P foi igual ou menor que 0,05.

## 4 - RESULTADOS

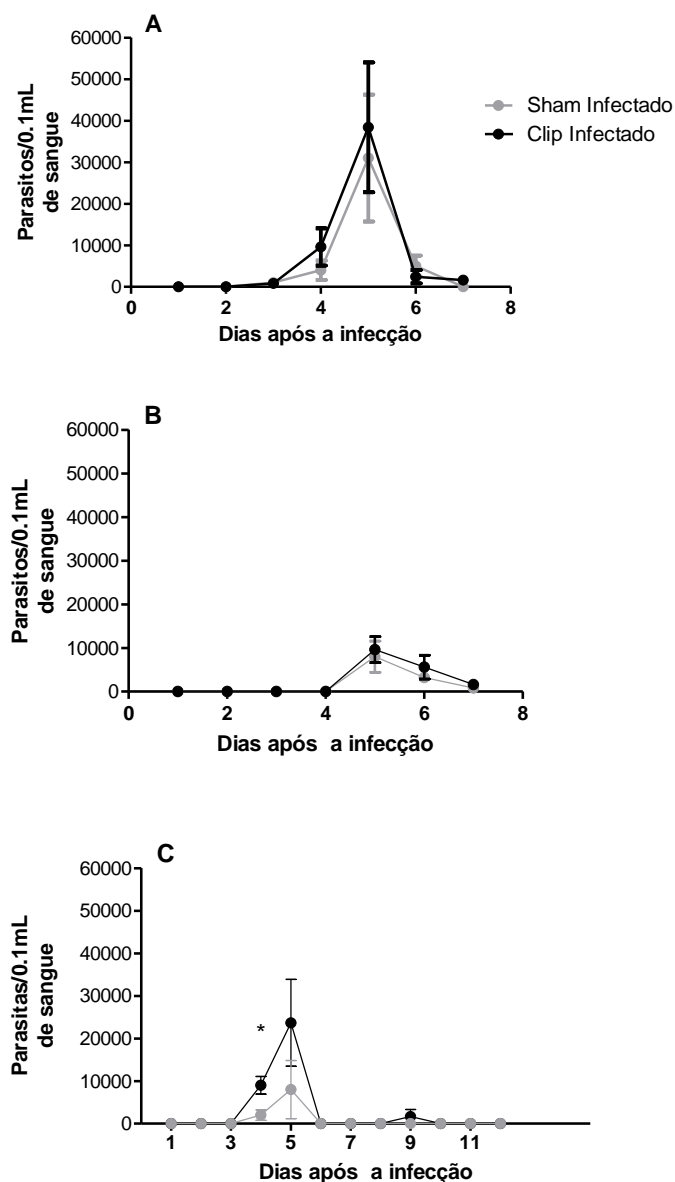
### 4.1 - Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Diferentes inóculos ( $3 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$  e  $1,2 \times 10^6$ ) contendo formas tripomastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) foram utilizadas para escolha do inóculo ideal para os experimentos posteriores, levando em consideração o pico de parasitemia e a sobrevivência dos animais. Observou-se maior parasitemia naqueles animais infectados com  $1,2 \times 10^6$  parasitos (Figura 7). Por outro lado, não foi observada variação no período pré-patente nem mortalidade com nenhum dos inóculos e, dessa forma, optou-se pelo maior inóculo do parasito para os experimentos subsequentes.



**Figura 7: Curva de parasitemia com diferentes inóculos do *Trypanosoma cruzi*:** Ratos Wistars machos foram infectados com diferentes inóculos do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e a quantificação diária dos parasitos circulantes apresentadas. Os dados são apresentados como média de parasitos/dia e analisados pelo teste T Students, sendo significativo o  $p < 0.05$ .

A seguir, efetuou-se a infecção dos animais em diferentes momentos de experimentação. As curvas de parasitemia obtidas tanto para os animais normotensos quanto hipertensos apresentaram ligeira elevação da parasitemia dos animais hipertensos, não houve diferença entre os grupos, apresentando inclusive, o mesmo período pré patente e tempo de parasitemia. A taxa de sobrevivência dos animais foi de 100% em todos os grupos analisados durante os experimentos de 1 e 4 semanas e de 100% para SNI; 60% para SI (dados não demonstrados).

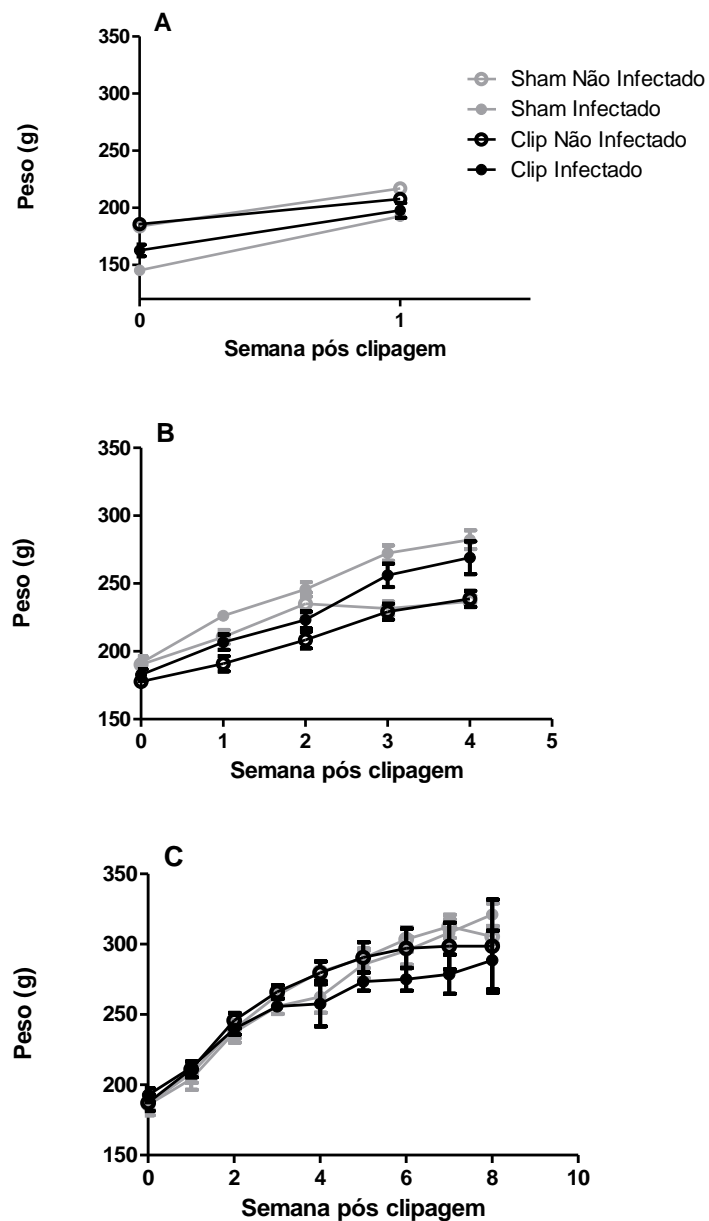


**Figura 8: Curvas de parasitemia.** Foram inoculados  $1,2 \times 10^6$  formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em diferentes momentos de experimentação sendo, logo após a cirurgia nos experimentos (A) 1 semana de clipagem- 1 semana de infecção ( $n=5/\text{grupo}$ ), (B) 4 semanas de clipagem- 1 semana de infecção ( $n=5/\text{grupo}$ ) e (C) 8 semanas de clipagem - 8 semanas de infecção ( $n=5/\text{grupo}$ ). Os dados acima foram apresentados como média $\pm$  SEM e analisados por OneWay ANOVA (Bonferroni) e teste t student, sendo significativo o  $p < 0.05$ . Letras diferentes significam diferença entre os grupos.

#### 4.2 - Variação do peso corporal

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente juntamente com a pletismografia. Não foi observada variação no peso corporal dos animais do grupo 1

semana (Figura 9-A), 4 semana (Figura 9-b) nem 8 semanas (Figura 9-c), independentemente da presença das variáveis hipertensão ou infecção.

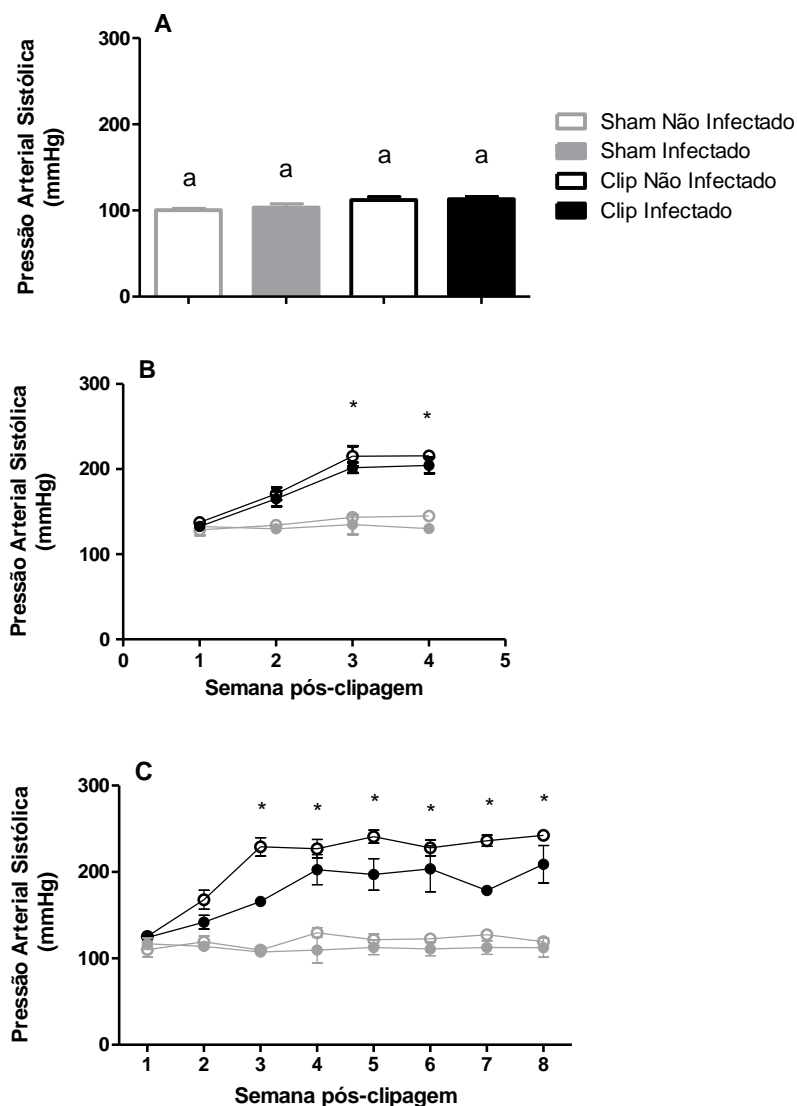


**Figura 9: Acompanhamento do peso corporal:** os animais foram pesados semanalmente e a média dos pesos por grupo representados nos experimentos de (A) 1 semana (n=5/grupo), (B) 4 semanas (n=5/grupo) e (C) 8 semanas (n=5/grupo). Os dados acima foram apresentados como média $\pm$  SEM e analisados por OneWay ANOVA (teste Bonferroni), sendo considerado significativo o  $p < 0.05$ .



### 4.3 - Parâmetros de pressão arterial sistólica e dosagem plasmática de Angiotensina II

Para avaliar a eficácia da cirurgia renovascular (2R1C), foi aferida a pressão arterial sistólica dos animais juntamente com a quantificação sérica de Angiotensina II. A avaliação da pressão arterial ocorreu por pletismografia indireta de cauda durante 1, 4 ou 8 semanas.

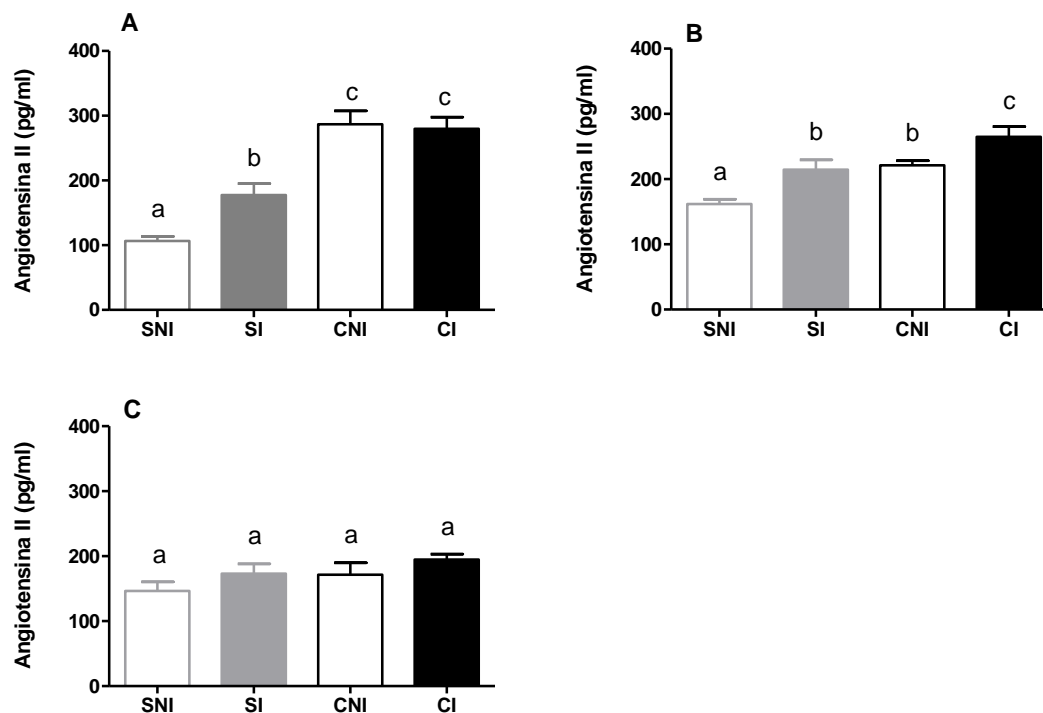


**Figura 10: Parâmetros pressóricos.** Os animais foram avaliados semanalmente após a cirurgia renovascular nos experimentos de (A) 1 semana (n=5/grupo), (B) 4 semanas (n=5/grupo) e (C) 8 semanas (n=5/grupo). Os valores de cada ponto representam a média  $\pm$  SEM encontrada para cada grupo avaliado na respectiva semana e analisados por OneWay ANOVA (Bonferroni), sendo significativo o  $p < 0.05$ . Letras diferentes significam diferença entre os grupos. \*diferença entre os grupos hipertensos e normotensos.

Nos experimentos de 4 e 8 semanas (Figuras 10-B e 10-C respectivamente) os valores da pressão arterial sistólica dos animais hipertensos - clip (infectados ou não) foram superiores aos animais normotensos - sham (infectados ou não) a partir da terceira semana após a realização da cirurgia 2R1C. No experimento de 1 semana (Figura 10-A) não se observou diferença entre os grupos hipertensos e normotensos, independentemente da infecção. Em nenhum experimento houve diferença na hipertensão arterial entre os infectados e não infectados do mesmo grupo. No experimento de 4 semanas, houve um aumento dos animais hipertensos a partir da 2ª semana, independente da presença do parasito e, a partir da 3ª semana esta diferença foi evidenciada (Figura 10-B).

Da mesma forma, no experimento de 8 semanas observou-se diferença entre os grupos hipertensos e normotensos somente a partir da terceira semana, sendo esta diferença mantida até a oitava semana. Estes dados foram similares aos dados de pressão arterial média e diastólica nestes mesmos animais (dados não mostrados).

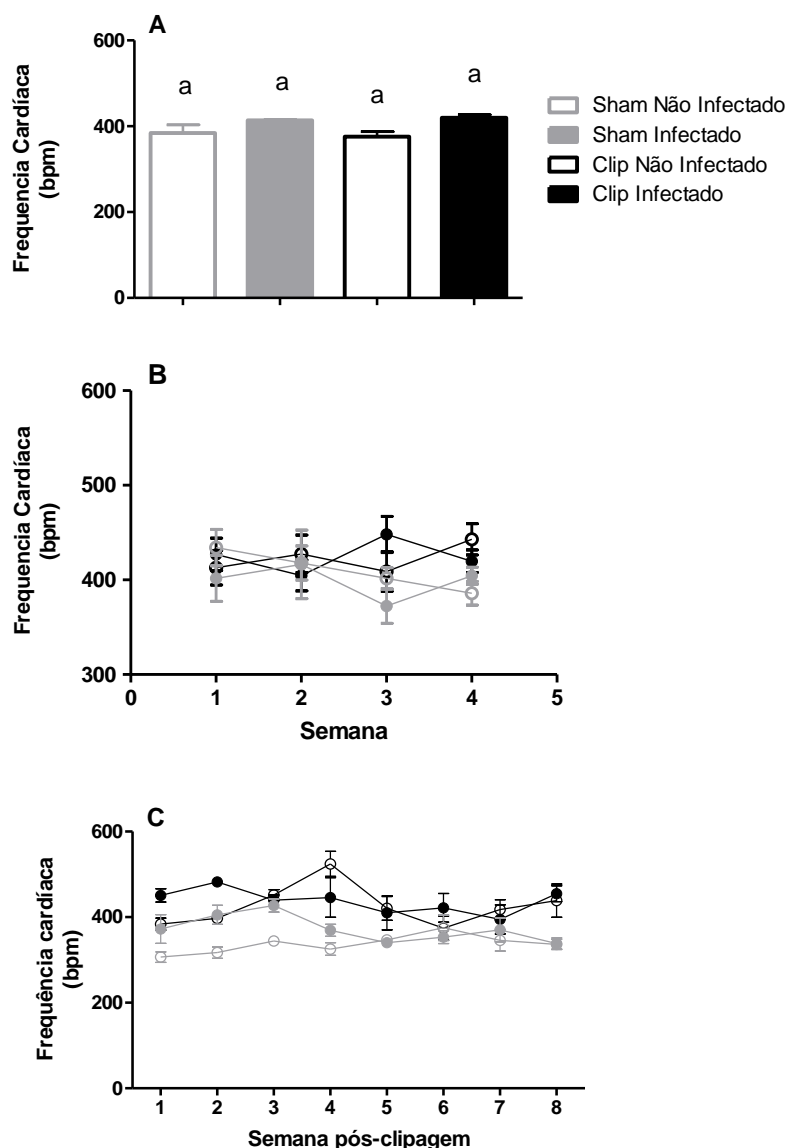
Sendo o Sistema Renina-Angiotensina o responsável pela fase inicial nesse tipo de hipertensão, foi realizada a dosagem plasmática, em todos os animais, do peptídeo Angiotensina II, para confirmar a hipertensão nos animais. Verificou-se que a produção de Angiotensina II nos animais clipados foi superior à dos animais controles para a hipertensão no experimento de 1 semana bem como nos animais não clipados, mas infectados pelo parasito (Figura 11-A). Após experimento de 4 semanas, observou-se padrão similar entre os animais não clipados e infectados com aqueles clipados apenas. No entanto, a associação entre o *T.cruzi* e a cirurgia renovascular, foi capaz de elevar ainda mais os níveis de Angiotensina II nesses animais (Figura 11-B) No experimento de 8 semanas todos os grupos apresentaram níveis similares de Angio II.



**Figura 11: Avaliação dos níveis séricos de Angiotensina II (Angio II):** A Angio II foi avaliada pela técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA), a partir do soro dos animais dos experimentos de (A) 1 semana (n=5/grupo), (B) 4 semanas (n=5/grupo) e (C) 8 semanas (n=5/grupo). Os valores representam a média+/-SEM encontrada para cada grupo avaliado na última semana do respectivo experimento e analisados por OneWay ANOVA (Bonferroni) com confirmação pelo Teste T de Student, sendo significativo o  $p < 0.05$ . Letras diferentes significam diferença entre os grupos. SNI: sham não infectado, SI: sham infectado, CNI: clip não infectado, CI: clip infectado.

#### 4.4 - Frequência cardíaca

A frequência cardíaca foi avaliada juntamente com a pletismografia indireta de cauda, no entanto percebe-se nas Figuras 12-A, 12-B e 12-C que nem o aumento da pressão nem a infecção pelo *T. cruzi* alteraram a frequência cardíaca dos animais. Os valores apresentados são a média semanal dos grupos em cada experimento.

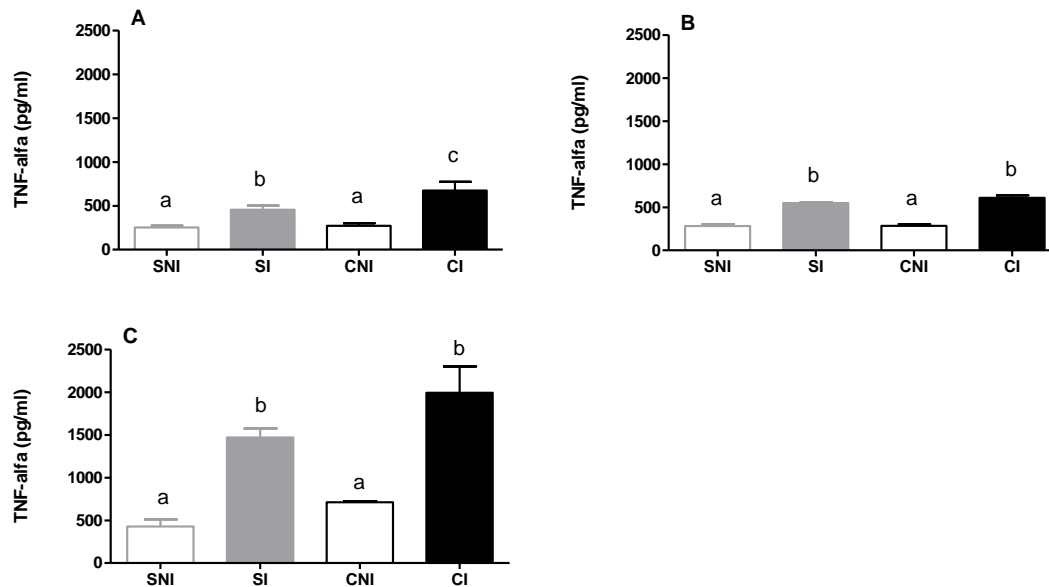


**Figura 12: Avaliação da frequência cardíaca:** A avaliação da frequência cardíaca foi feita pelo pletismógrafo digital no mesmo momento da avaliação das pressões arteriais em animais infectados (ou não) pelo *Trypanosoma cruzi*, submetidos (ou não) à cirurgia renovascular. Os valores são dados como média de cada grupo em batimento por minuto (bpm) dos experimentos de (Figura 11-A) 1 semana (n=5/grupo), (Figura 11-B) 4 semanas (n=5/grupo) e (Figura 11-C) 8 semanas (n=5/grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$  SEM e analisados por OneWay ANOVA (Bonferroni), sendo significativo o  $p < 0.05$ . SNI: sham não infectado, SI: sham infectado, CNI: clip não infectado, CI: clip infectado

#### 4.5 - Dosagem plasmática de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e Fractalkine (CX3CL1)

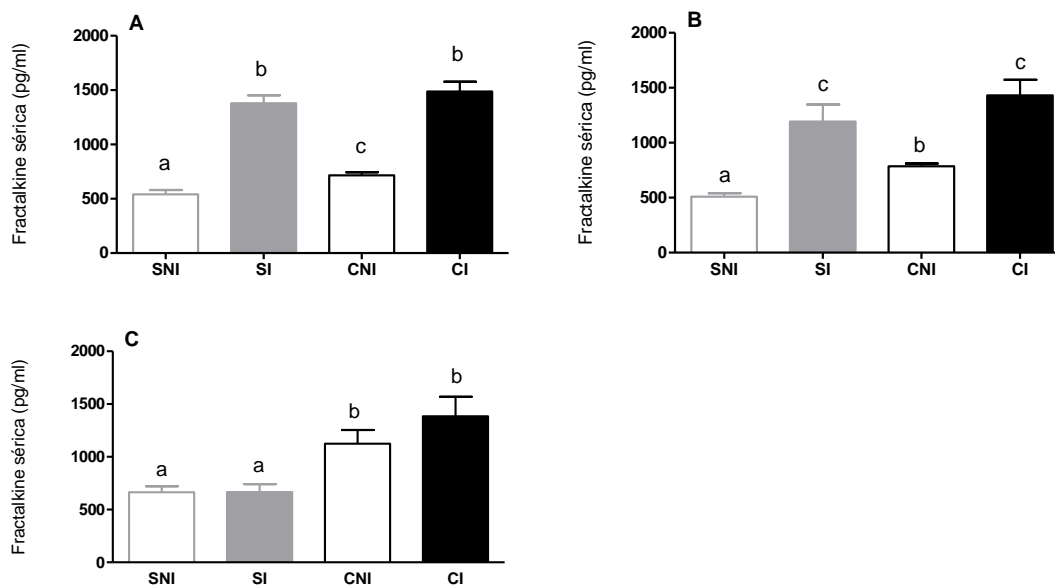
Foi observada uma elevada produção de TNF-alfa nos animais infectados pelo *T. cruzi*, independentemente da presença da hipertensão (Figuras 13-A, 13-B e 13-C), sendo

que no experimento de 1 semana os animais submetidos à cirurgia 2RIC e infectados pelo *T. cruzi*, apresentaram níveis mais elevados que os animais infectados normotensos (Figura 12-A).



**Figura 13: Avaliação dos níveis séricos de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa):** O TNF- $\alpha$  foi avaliado por imunoenensaio enzimático a partir do soro dos animais dos experimentos de (Figura 13-A) 1 semana (n=5/grupo), (Figura 13-B) 4 semanas (n=5/grupo) e (Figura 13-C) 8 semanas (n=5/grupo). Os valores representam a média $\pm$  SEM da concentração de TNF- $\alpha$  encontrada para cada grupo avaliado na última semana do respectivo experimento e analisados por OneWay ANOVA (teste Bonferroni) com confirmação pelo Teste T de Student, sendo significativo o  $p < 0.05$ . Letras diferentes significam diferença entre os grupos. SNI: sham não infectado, SI: sham infectado, CNI: clip não infectado, CI: clip infectado

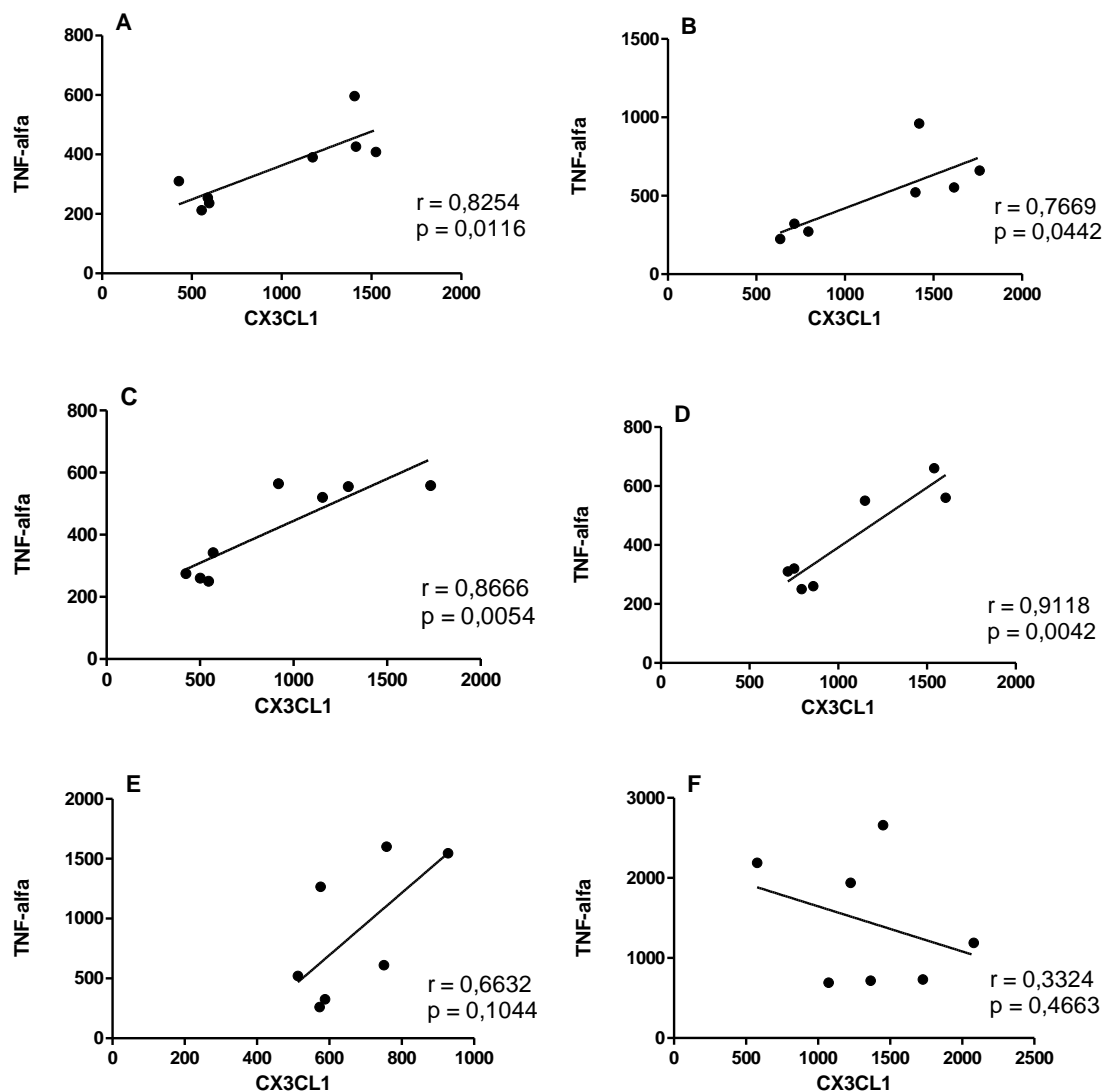
De forma similar ao observado para o TNF-alfa, os níveis séricos da Fractalkine no experimento de 1 semana (Figura 14-A) e experimento de 4 semanas (Figura 14-B) mostraram-se elevados nos animais submetidos à cirurgia renovascular, mas esses níveis foram intensificados na presença do *T. cruzi*, quando comparados aos animais não infectados. Seguindo este resultado, no experimento de 8 semanas (Figura 13-C) a Fractalkine aparece elevada apenas nos animais hipertensos, independentemente da infecção pelo *T. cruzi*.



**Figura 14: Avaliação dos níveis séricos de Fractalkine/CX3CL1** A Fractalkine foi avaliada pela técnica de imunoenensaio enzimático a partir do soro dos animais dos experimentos de: (Figura 14-A) 1 semana (n=5/grupo), (Figura 14-B) 4 semanas (n=5/grupo) e (Figura 14-C) 8 semanas (n=5/grupo). Os valores representam a média $\pm$  SEM de Fractalkine encontrada para cada grupo avaliado na última semana do respectivo experimento e analisados por OneWay ANOVA (Bonferroni) com confirmação pelo teste T de Student, sendo significativo o  $p < 0.05$ . Letras diferentes significam diferença entre os grupos. SNI: sham não infectado, SI: sham infectado, CNI: clip não infectado, CI: clip infectado

Levando em consideração a escassez de estudos sobre a Fractalkine na infecção pelo *T. cruzi* e conhecendo-se a importância do TNF- $\alpha$  como uma citocina chave no processo inflamatório inicial e como marcador de prognóstico clínico em seres humanos, realizou-se análises de correlação destas citocinas em cada etapa dos experimentos. A correlação destas citocinas foi feita em cada experimento analisando sempre os Shams e os animais submetidos à cirurgia renovascular, separadamente.

A correlação observada para estas citocinas foi positiva para os experimentos de 1 semana (Figura 15-A) e 4 semanas (Figura 15-B), ou seja, quanto maior a concentração de TNF- $\alpha$  no soro, maior também a concentração de CX3CL1. Lembrando que os animais não foram analisados em função da infecção e sim da hipertensão, independentemente se esta já estava, ou não, estabelecida. No entanto, ao longo das semanas de experimento, esta correlação tornou-se negativa (Figuras 15-C)



**Figura 15: Correlação dos níveis das citocinas Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  e Fractalkine:** Testes de correlação foram aplicados para a produção de TNF-alfa e para a Fractalkine em diferentes etapas da infecção e da indução da hipertensão pela cirurgia 2R1C sendo, (Figura 15-A) Sham 1 semana, (Figura 15-B) Clips 1 semana, (Figura 15-C) Sham 4 semanas, (Figura 15-D) Clips 4 semanas, (Figura 15-E) Sham 8 semanas, (Figura 15-F) Clips 8 semanas. Os dados foram analisados por regressão linear utilizando o programa Graphic Prism 5.

#### 4.6 - Avaliações histopatológicas

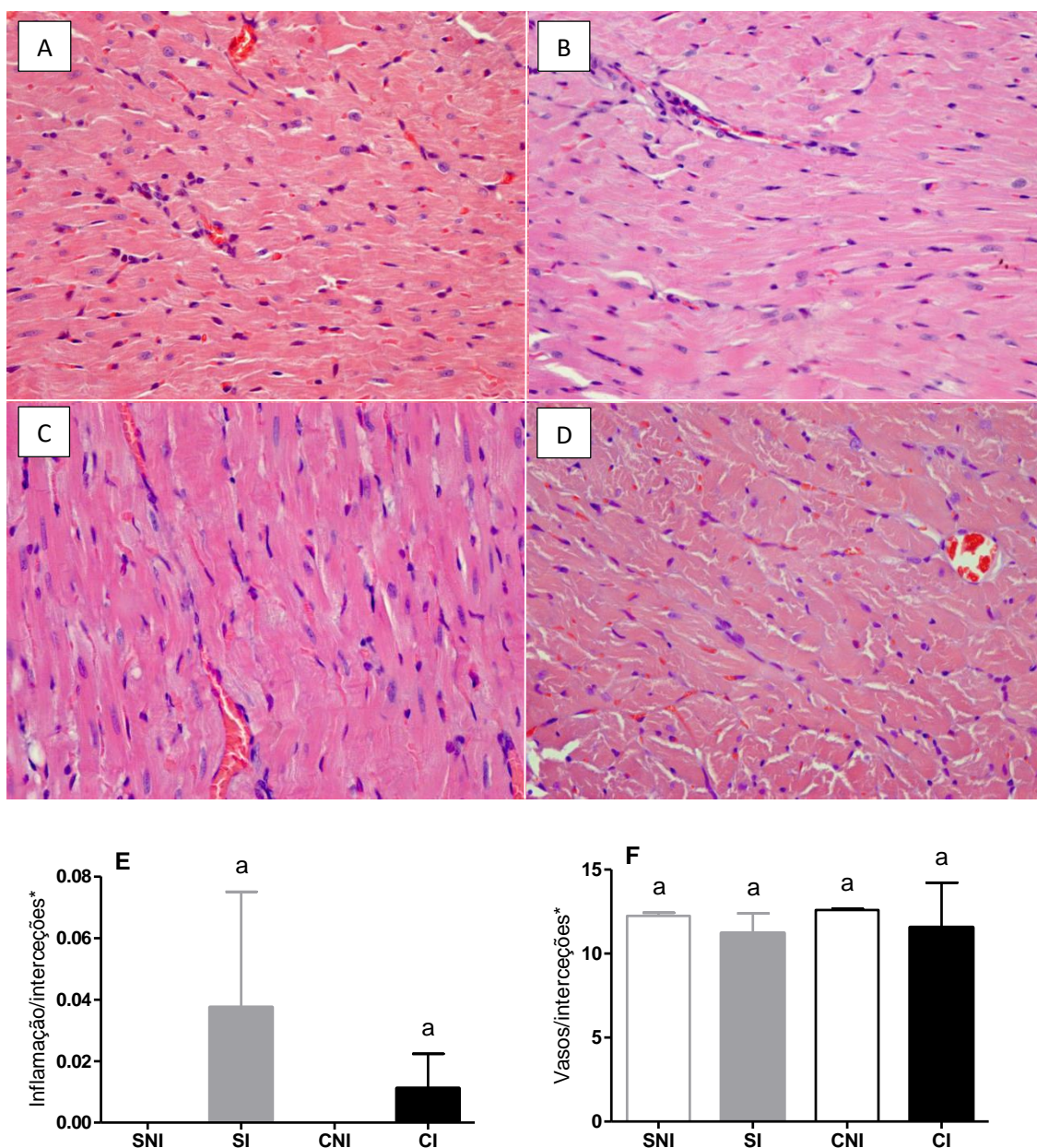
As análises histopatológicas dos tecidos cardíacos dos animais foram feitas com o intuito de verificar as alterações morfológicas e inflamatórias. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas através do programa ImajeJ 1.44o.

As inflamações teciduais e perivasculares foram analisadas nos animais. No entanto, para melhor entendimento dos dados resolvemos mostrar estes dados somados

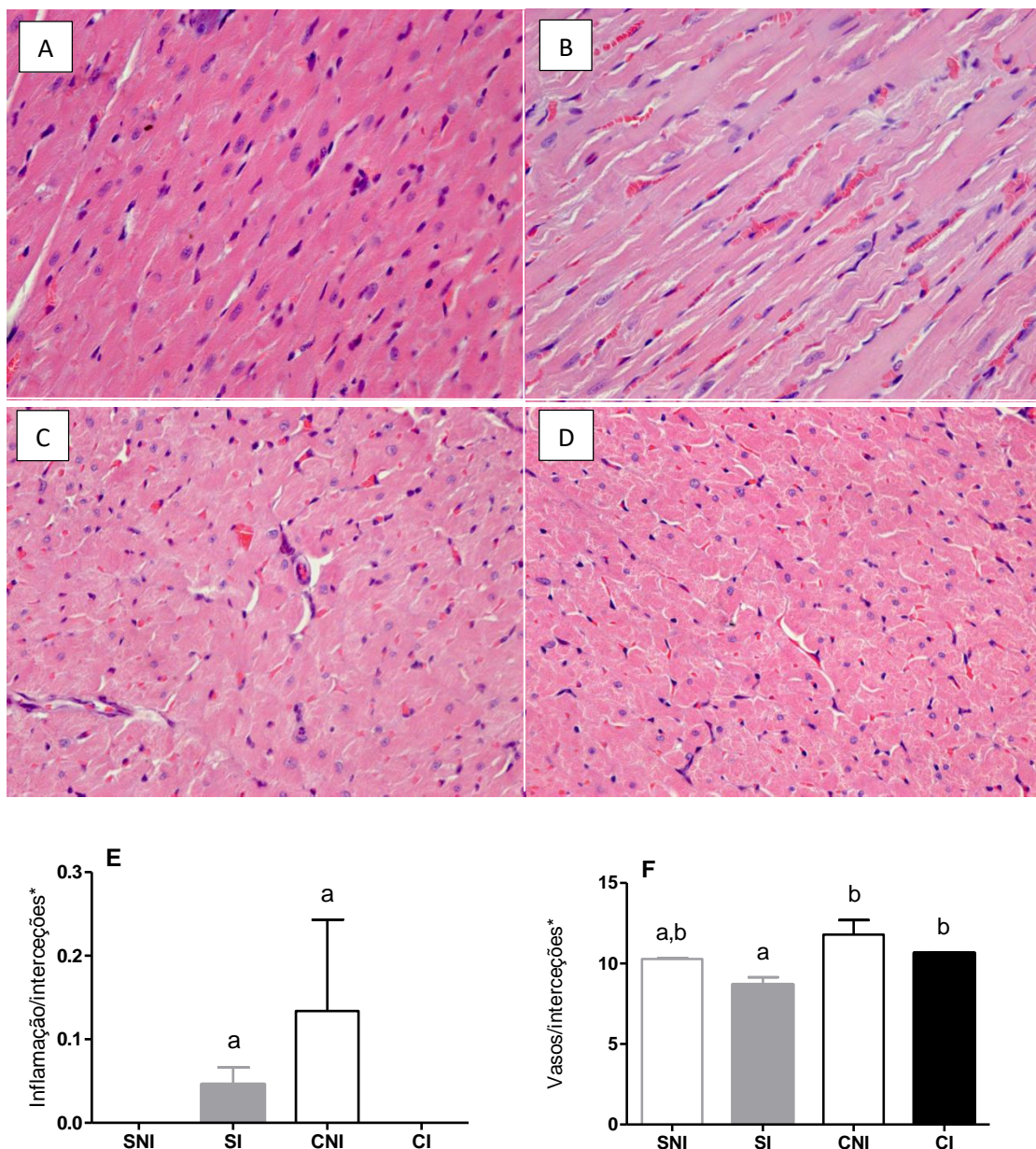
em um só gráfico, já que como visto nas Figuras 16-E, 17-E e 18-E, não houve diferença entre os grupos dos animais hipertensos e normotensos, infectados ou não.

A quantificação vascular foi avaliada no tecido cardíaco em animais com 1 semana (Figura 16-F) não havendo diferença entre os grupos. No experimento de 4 semanas (Figura 17-F) ocorre uma diminuição no número de vasos dos animais normotensos infectados, e no experimento de 8 semanas (Figura 18-F) observou-se uma diminuição no número de vasos nos tecidos cardíacos de animais normotensos não infectados quando comparados aos animais hipertensos. Contudo esta diferença não foi observada quando os animais normotensos infectados foram analisados em relação aos outros grupos.

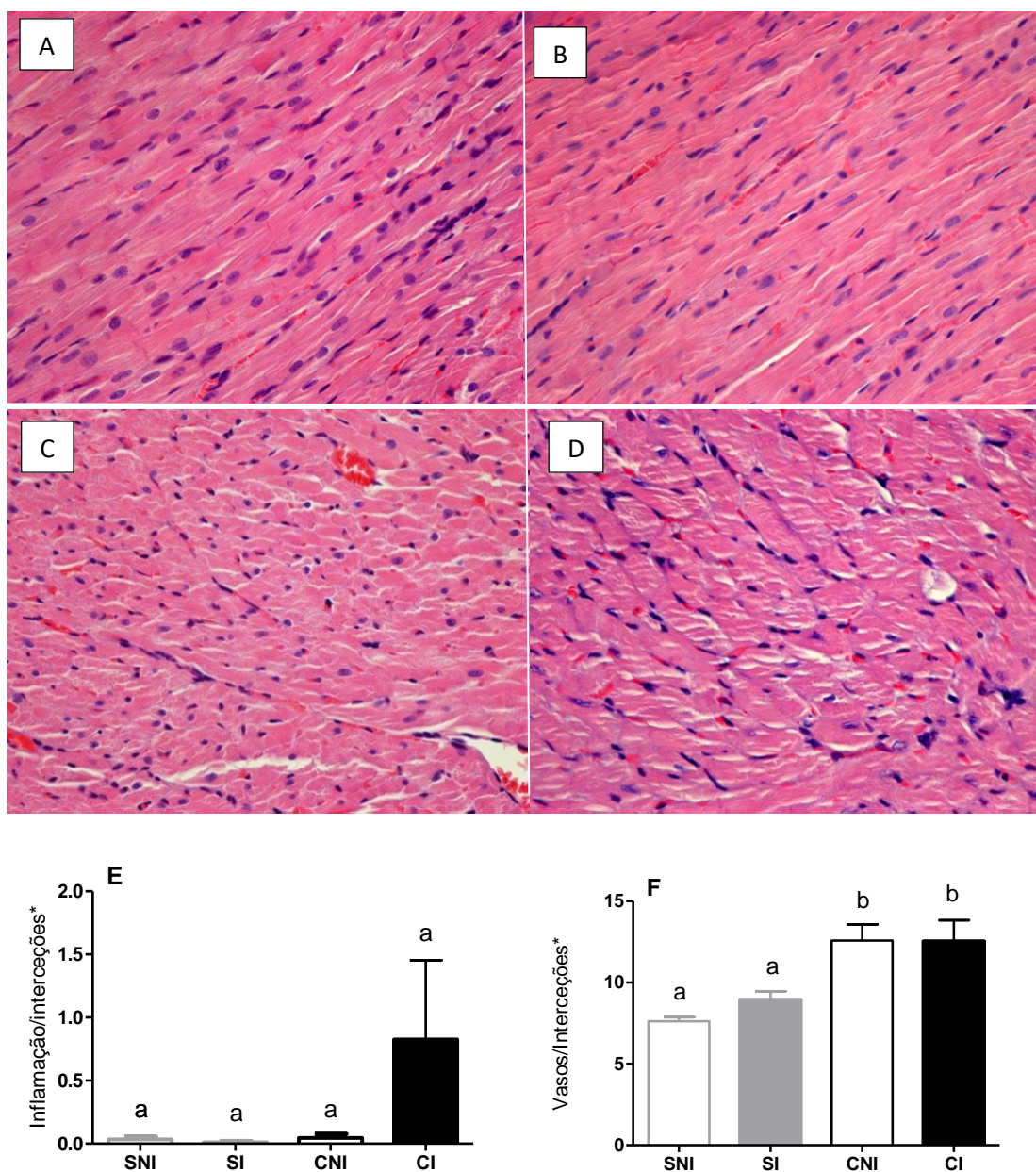




**Figura 16: Análise histopatológica para vasos e inflamação no experimento de 1 semana (1 semana de cirurgia e de infecção):** Cortes histológicos (5  $\mu$ m) de corações de ratos Wistars machos infectados, ou não, com  $1,2 \times 10^6$  formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram corados com hematoxilina-eosina, sendo (Figura 16-A) Sham não infectado (n=5); (Figura 16-B) Sham infectado (n=5); (Figura 16-C) Clip não infectado (n=5), (Figura 16-D) Clip infectado (n=5); (Figura 16-E) Quantificação da inflamação (n=5/grupo) e (Figura 16-F) Quantificação dos vasos (n=5/grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$  SEM e analisados por OneWay ANOVA (teste Bonferroni), sendo significativo o  $p < 0.05$ . \*Focos de inflamação ou vasos quantificados em 99 interseções formadas pela grade virtual inserida sobre a foto. SNI: sham não infectado, SI: sham infectado, CNI: clip não infectado, CI: clip infectado. Aumento de 400X.



**Figura 17: Análise histopatológica para vasos e inflamação no experimento de 4 semana (4 semana de cirurgia e 1 de infecção):** Cortes histológicos (5  $\mu$ m) de corações de ratos Wistars machos infectados, ou não, com  $1,2 \times 10^6$  formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram corados com hematoxilina-eosina, sendo (Figura 17-A) Sham não infectado (n=5); (Figura 17-B) Sham infectado (n=5); (Figura 17-C) Clip não infectado (n=5), (Figura 17-D) Clip infectado (n=5); (Figura 17-E) Quantificação da inflamação (n=5/grupo) e (Figura 17-F) Quantificação dos vasos (n=5/grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$  SEM e analisados por OneWay ANOVA (teste Bonferroni), sendo significativo o  $p < 0.05$ . \*Focos de inflamação ou vasos quantificados em 99 interseções formadas pela grade virtual inserida sobre a foto. SNI: sham não infectado, SI: sham infectado, CNI: clip não infectado, CI: clip infectado. Aumento de 400X.



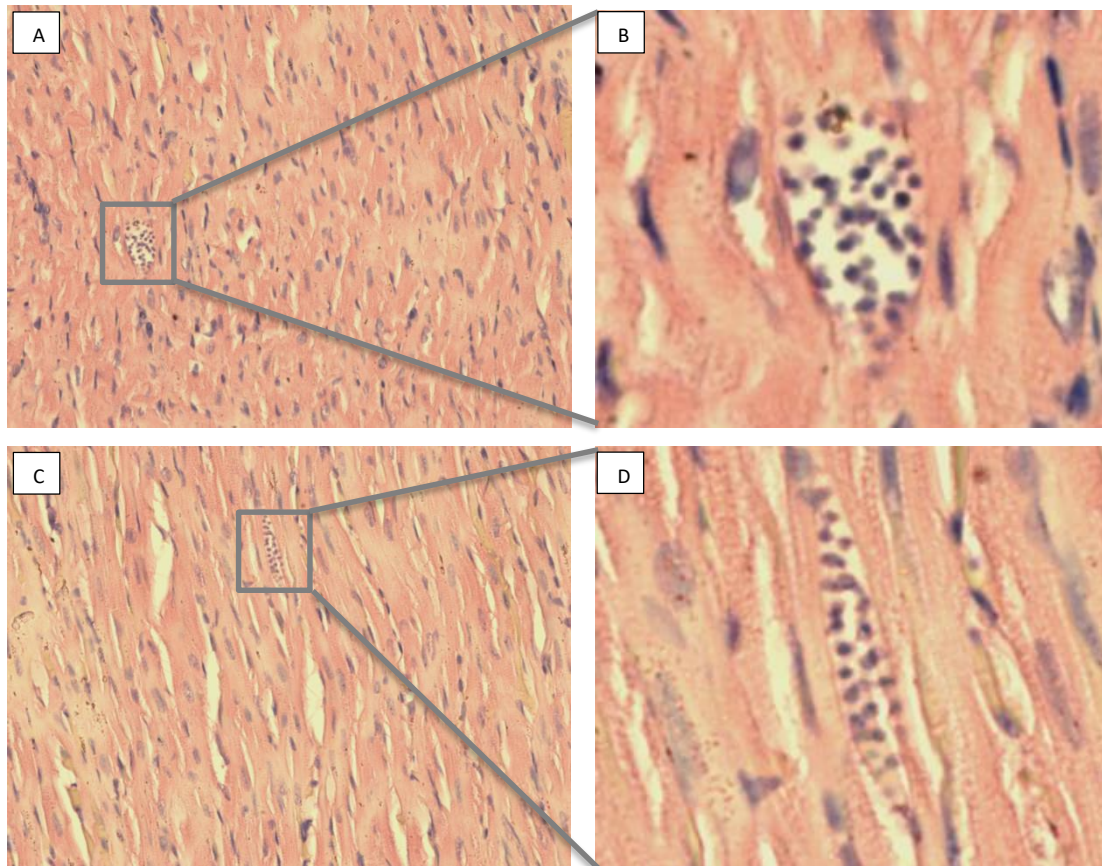
**Figura 18: Análise histopatológica para vasos e inflamação no experimento de 8 semana (8 semana de cirurgia e de infecção):** Cortes histológicos (5  $\mu$ m) de corações de ratos Wistars machos infectados, ou não, com  $1,2 \times 10^6$  formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram corados com hematoxilina-eosina, sendo (Figura 18-A) Sham não infectado (n=5); (Figura 18-B) Sham infectado (n=5); (Figura 18-C) Clip não infectado (n=5), (Figura 18-D) Clip infectado (n=5); (Figura 18-E) Quantificação da inflamação (n=5/grupo) e (Figura 18-F) Quantificação dos vasos(n=5/grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$  SEM e analisados por OneWay ANOVA (teste Bonferroni), sendo significativo o  $p < 0.05$ . \*Focos de inflamação ou vasos quantificados em 99 interseções formadas pela grade virtual inserida sobre a foto. SNI: sham não infectado, SI: sham infectado, CNI: clip não infectado, CI: clip infectado. Aumento de 400X.

#### 4.7 - Quantificação de ninhos de amastigotas nos tecidos

Apesar da reduzida presença de ninhos de amastigota no tecido cardíaco dos ratos infectados pelo *T. cruzi* observou-se esses parasitos teciduais em animais normotensos infectados de 1 semana (Tabela I, Figura 19-A e 19-B) e 4 semanas (Tabela I, Figura 19-C e 19-D), reforçando que o experimento de 4 semana possui apenas 1 semana de infecção. Por outro lado, nos experimento de 8 semanas não foi encontrado nenhum ninho de amastigotas. Os dados abaixo foram apresentados como média\* $\pm$  SEM e analisados por OneWay ANOVA (Bonferroni), sendo significativo o  $p < 0.05$ . \*Média do número de ninhos de amastigotas encontrados/99 interseções formadas pela grade virtual inserida sobre a foto. SI: sham infectado; CI: Clip infectado.

**Tabela I: Quantificação de ninhos de amastigotas:** Animais infectados por *Trypanosoma cruzi* com diferentes períodos de infecção.

Grupos	Valores (Média $\pm$ SEM)*	Grupos	Valores (Média $\pm$ SEM)*
SI (1 semana)	0,1 $\pm$ 0,1	CI (1 semana)	0,0 $\pm$ 0,0
SI (4 semanas)	0,1 $\pm$ 0,1	CI (4 semanas)	0,0 $\pm$ 0,0
SI (8 semanas)	0,0 $\pm$ 0,0	CI (8 semanas)	0,0 $\pm$ 0,0



**Figura 19: Análise histopatológica em ninhos de amastigotas do *Trypanosoma cruzi*.** Cortes histológicos (5  $\mu\text{m}$ ) de corações de ratos Wistars machos infectados com  $1,2 \times 10^6$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* e corados com hematoxilina-eosina. (Figura 19-A) Sham infectado com 1 semana de infecção (n=5); (Figura 19-B) destaque do ninho presente na lâmina (Figura-A); (Figura-C) Sham infectado com 4 semanas de experimento (uma semana de infecção) (n=5); (Figura-D) destaque do ninho presente na lâmina (Figura-C). Não foram encontrados ninho de amastigotas no experimento de 8 semanas (8 semanas de infecção). (A) e (B): Aumento de 400X

## 5. - Discussão

A doença de Chagas é uma importante doença que, apesar de ultrapassar um século de sua descoberta, ainda acomete milhares de indivíduos em toda a América Latina tornando-se uma preocupação para o setor de saúde pública de diferentes países. Por outro lado, tanto no Brasil quanto em alguns países do Cone Sul, tem se observado uma redução na incidência da doença de Chagas, em razão do continuado controle de triatomíneos, da rigorosa seleção para doadores de sangue e órgãos e da modernização das áreas rurais. Desde 1991 o Brasil vem somando esforços para o controle desta doença, e em 2006 a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) da Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou o país livre da transmissão pela principal espécie vetora, o *Triatoma infestans*. Além disso, o risco de transmissão por transfusão sanguínea também diminuiu em toda a América Latina (WHO, 2010). É sabido que a maior parte dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* encontra-se, atualmente, na fase crônica da doença e, assumindo que a infecção tenha ocorrido na infância e/ou adolescência, esses indivíduos hoje são adultos e/ou idosos, em sua maioria. E é justamente nessa faixa etária que a população encontra-se mais propensa a desenvolver a hipertensão arterial secundária (Lolio, 1990; Barbosa *et al*, 2008; Ulbrich *et al*, 2012; Horacek *et al*, 2012). Sabe-se que tanto a doença de Chagas quanto a hipertensão arterial possuem caráter inflamatório (Tarleton *et al*, 1996; Talvani *et al*, 2000; Chandrasekar *et al*, 2003), mas, estudos experimentais para análise da interação destas doenças ainda são escassos.

Uma proposta para avaliar a interação dessas duas doenças no mesmo modelo animal foi a utilização do rato Wistars para a indução de hipertensão arterial através do método cirúrgico 2 rins 1 clip (2R1C), descrito por Goldblatt em 1934. O rato Wistar adulto é um animal resistente à infecção pelo *T. cruzi* visto que apesar de apresentar uma curva parasitêmica curta e baixa, não desenvolve alterações fisiopatológicas consequentes desta parasitemia. No entanto, este modelo foi escolhido pela necessidade de se realizar com precisão a cirurgia renovascular, já que animais mais susceptíveis como os camundongos ou os próprios Wistars mais novos são inviáveis para tal cirurgia devido ao calibre da artéria renal e o grau de constrição utilizado. Um fato que demonstra a resistência do animal pôde ser observada com o inóculo de  $1,2 \times 10^6$  parasitos/animal e, ainda assim, sendo detectado um pico de parasitemia relativamente baixo com ausência de mortalidade nos animais, fato que não seria observada em outros roedores como camundongos ou ratos mais jovens (Paula Costa *et al*, 2010, Caldas *et al*, 2008 e Martins,

2010). De acordo com Miguel Basombrio (1981) os animais jovens apresentam maior incidência da doença que animais idosos. E, em nosso estudo, os animais estavam com 180-200g, o que representa uma idade de aproximadamente 2,5 meses, ideal para o desenvolvimento da hipertensão renovascular.

Sabe-se que o sobrepeso é um fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão (Carneiro *et al*, 2003; Cabral *et al*, 2003; Nunes *et al*, 2006), sendo responsável por até 65 a 75% do risco de desenvolvimento de hipertensão primária (Guyton & Hall, 2011). Uma das possíveis justificativas para isso seria que os adipócitos são, hoje, considerados uma fonte de mediadores pró-inflamatórios que contribuem para injúria vascular, resistência insulínica e aterogênese (Gomes, 2010). Desconhece-se a causa da hipertensão arterial, porém o sobrepeso está diretamente ligado à elevação da pressão arterial, assim como o sedentarismo, estresse, tabagismo, envelhecimento, raça, gênero, fatores dietéticos e histórico familiar (Molina *et al*, 2003). Além do fato de cada faixa etária ter diferentes causas para a hipertensão arterial (Salgado & Carvalhaes, 2003)

Nesse estudo, não foram observadas alterações nos pesos dos animais associados à hipertensão ou à infecção por *T. cruzi*. Percebe-se que os animais, independentemente do grupo experimental tiveram disponibilidade de água e ração *ad libitum*, além de não terem sido submetidos a nenhum exercício físico.

A pressão arterial e a produção de Angiotensina II foram avaliadas periodicamente nesses animais. A pletismografia de cauda, utilizada neste trabalho, foi utilizada para avaliar os níveis de pressão arterial sistólica, por ser uma técnica de baixo custo, fácil manuseio e, principalmente, não invasiva, o que reduz o risco de infecções, em se tratando de animais infectados com *T. cruzi*. Além disto, estudos validam esta técnica demonstrando boa correlação entre as medidas indiretas de pressão sanguínea (pletismografia de cauda) e medidas diretas, como a canulação da artéria femoral, por exemplo (Krege *et al*, 1995; Ibrahim *et al*, 2006). Os dados da pletismografia mostraram que a partir da 3ª semana havia hipertensão arterial tanto no experimento de 4 semanas quanto no experimento de 8 semanas. Batlouni (2001) relata o fato de que integridade do endotélio é essencial à regulação do tono vascular e estrutura dos vasos, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular. O endotélio desempenha um papel fundamental em várias doenças cardiovasculares, sobretudo pelo desequilíbrio entre a liberação de fatores vasodilatadores antiproliferativos e proliferativos. Na disfunção endotelial, ocorre predomínio dos fatores contráteis, induzindo aumento da resistência vascular periférica e hipertrofia/hiperplasia da parede vascular. Esta disfunção endotelial é promovida pela

Angiotensina II por meio de uma variedade de ações que influenciam os diversos estágios de seu desenvolvimento entre outras coisas pela síntese de substâncias como Angiotensina II e espécies reativas do oxigênio. Dados da literatura demonstram que, após a cirurgia 2R1C, o desenvolvimento da hipertensão renovascular é caracterizado por estimulação de sistema renina-Angiotensina (Guan *et al*, 1992; Deforrest *et al*, 1982; Cervenka *et al*, 2002 e Lazartigues *et al*, 2004). Sabendo disto, avaliamos os níveis de Angiotensina II circulantes nos nossos animais para confirmar os achados da pletismografia, visto que o aumento de Angio-II no experimento de uma semana pressupõe o futuro aumento da pressão arterial sistólica destes animais. Lazartigues e colaboradores (2004) e Guan e colaboradores (1992) demonstraram que após a quarta semana de cirurgia, os níveis de Angio II no plasma estabilizam semelhantes aos animais normotensos, no entanto, estes níveis em outros órgãos, como o tronco cerebral e hipotálamo apresenta-se aumentada. Este aumento em alguns órgãos poderia justificar o fato dos animais apresentarem baixo nível de Angio II no plasma e mesmo assim apresentarem uma constante pressão arterial elevada. Os estudos citados anteriormente não envolvem a presença da infecção pelo *T. cruzi*. Era esperado um pequeno aumento da pressão arterial dos animais clipados e infectados, em relação aos não infectados, visto que o TNF- $\alpha$  além de induzir a hipertrofia cardíaca *in vivo*, provoca o aumento na expressão de receptores AT1, elevando o efeito mediado pela Angiotensina II (Peng, 2002). No entanto, o que observou-se em nosso estudo foi que o parasito não foi capaz de interferir nos níveis pressóricos de ratos submetidos à cirurgia 2R1C. A hipótese para isso é o fato de o TNF- $\alpha$  elevar o efeito mediado pela Angiotensina II em favor da fibrose cardíaca. A fibrose correlaciona-se positivamente com as pressões arteriais média, sistólica e diastólica, porém estudo mostra que essa variável não é proporcional à fibrose cardíaca (Souza, 2010).

A frequência cardíaca tem relação direta com a pressão arterial, visto que a frequência cardíaca é um componente do débito cardíaco e a pressão arterial nada mais é que a relação do débito cardíaco com a resistência periférica.

$$\text{Pressão arterial} = \text{Débito cardíaco} \times \text{resistência periférica}$$

$$\text{Débito cardíaco} = \text{Frequência cardíaca} \times \text{Volume ejetado}$$

Esperava-se um aumento da pressão arterial, bem como da frequência cardíaca. No entanto em nosso estudo, não foram observadas diferenças na frequência cardíaca em nenhum dos grupos avaliados, independente da presença ou não do parasito ou de



hipertensão arterial. Com o débito cardíaco aumentado, a pressão arterial tenderia a aumentar também. Assim, hipotetizou-se que a Angiotensina II promoveria a retenção de sais e líquidos, elevando o volume ejetado e conseqüentemente o débito cardíaco, não havendo, necessariamente, aumento na frequência cardíaca. Esses dados estão de acordo com dados do Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Ouro Preto (Cangussu, 2008) e da literatura (Lazartigues *et al*, 2004, Rodrigues *et al*, 2007), onde animais hipertensos e normotensos sedentários (em modelos sem infecção pelo *T. cruzi*) apresentaram o mesmo padrão de frequência cardíaca.

Além dos aspectos fisiológicos de interface com a hipertensão e a infecção pelo *T. cruzi*, a inflamação tem sido reconhecida, hoje, como um fator significativo na fisiopatologia da hipertensão (Melo *et al*, 2007) e como um fator determinante na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Paula Costa *et al*, 2010). Alguns mediadores inflamatórios têm sido considerados peças fundamentais na arquitetura da resposta inflamatória tanto da hipertensão quanto da infecção pelo *T. cruzi*, como o TNF- $\alpha$  (Cunha-Neto *et al*, 2009, Talvani *et al*, 2012, Kasal & Neves, 2011).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida tanto por células da imunidade inata quanto da adquirida. Possui amplo espectro de funções, mas destaca-se seu envolvimento no processo inflamatório no qual promove o recrutamento e ativação de fagócitos. O TNF- $\alpha$  tem um importante papel no controle da infecção murina pelo *T. cruzi*, ativando os macrófagos a destruir intracelularmente o parasita. Por outro lado, estudos mostraram que tanto na fase aguda quanto na fase crônica os níveis séricos de TNF- $\alpha$  foram relacionados à evolução da doença e à gravidade da cardiopatia chagásica por Ferreira (2003) e Talvani (2004 e 2012), sugerindo a participação de TNF- $\alpha$  na formação da inflamação crônica e na lesão, podendo quem sabe ser usado como um indicador de prognóstico clínico (Cunha-Neto *et al*, 2009). Na hipertensão o TNF- $\alpha$  também tem um importante papel inflamatório, visto que ele reduz a os níveis de RNAm de e-NOS e conseqüentemente a biodisponibilidade de NO (Boos & Lip, 2006). Além disto o TNF- $\alpha$  também provoca o aumento na expressão de receptores AT1, elevando o efeito mediado pela Angiotensina II favorecendo a fibrose cardíaca. (Peng, 2002).

Nos nossos resultados vimos que o aumento constante do TNF- $\alpha$  encontrado nos animais está associado a presença do *T. cruzi*, podendo estar relacionado à inflamação autoimune causada pelo *T. cruzi* (Ferreira *et al*, 2003 e Talvani *et al*, 2004 e 2012). No experimento de 1 semana acreditamos que o aumento ainda maior do TNF- $\alpha$  nos animais infectados e hipertensos possa ser conseqüência da cirurgia, visto que foi colocado um

clip na artéria renal destes animais, ou até mesmo esteja ligado à inflamação causada pelo início da hipertensão. Isso deve-se principalmente pelo fato da Angio II ser capaz de regular a imunidade adaptativa podendo induzir a proliferação de células *Natural Killers* (NK) e de linfócitos T. Por exemplo, os linfócitos T de camundongos expressam um SRAA local, regulando sua ativação, marcadores de recrutamento tissular e a produção de TNF- $\alpha$  (Kasal & Neves, 2011).

Tão importante quanto o TNF-alfa que apresenta um papel na ativação celular durante o processo inflamatório, as quimiocinas surgem nesse cenário como agentes de recrutamento celular e, da mesma forma, contribuem substancialmente em ambas as doenças aqui descritas. Em particular, a CX3CL1/Fractalkine é uma quimiocina com papel em eventos inflamatórios vasculares (Chandrasekar *et al.*, 2003; Schober, 2008) e, até o momento não há descrição de sua ação sobre a infecção pelo *T. cruzi*. Recentemente, nosso grupo demonstrou em ratos jovens infectados pelo *T. cruzi* que os receptores da Fractalkine mostraram-se mais expressivos nestes animais quando comparados aos não infectados e que os níveis de Fractalkine aumentaram em função do tempo de infecção, no entanto, a presença desta citocina não altera o padrão inflamatório e nem de lesão tecidual cardíaco (Martins, 2010).

Dessa forma, acreditamos que a produção dessa quimiocina seja estimulada pela presença do parasito, assim como outras citocinas pró-inflamatórias (Talvani *et al.* 2000, Talvani & Teixeira 2011). Essa hipótese foi reforçada pelos altos níveis séricos de fractalkine dos animais infectados em fases iniciais de infecção independentemente da fase da hipertensão. No experimento de 1 e 4 semanas (essa última sendo 1 semana de infecção e 4 de cirurgia) os níveis de Fractalkine nos animais infectados apresentaram-se mais elevados que os níveis observados apenas nos animais clipados, sugerindo que a hipertensão poderia refletir a produção desta quimiocina, mas o parasito a intensificaria. Já no experimento de 8 semanas (8 semanas de cirurgia e de infecção) cujos parasitos não eram mais detectados na corrente sanguínea, os níveis de Fractalkine foram elevados apenas nos animais hipertensos. Provavelmente, isto acontece devido aos danos vasculares causados pela hipertensão. As células endoteliais parecem responder a este estímulo aumentando a produção da quimiocina fractalkine, que por sua vez serve como molécula de adesão para leucócitos mononucleares (Bazan *et al.*, 1997, Zhang, 2010). A fractalkine solúvel funciona como agente recrutante para monócitos/macrófagos, células *natural killers* (NK) e células T (Bazan *et al.*, 1997, Fong *et al.*, 1998, Zhang, 2010). Este recrutamento de leucócitos mononucleares em lesões vasculares através da sinalização de

CX3CL1-CX3CR1 promove o remodelamento vascular, podendo inclusive obstruir o vaso em consequência da multiplicação de células. (Zhang, 2010).

Sendo o TNF-alfa uma citocina de importante participação em ambas as doenças, foram avaliadas prováveis correlações entre o TNF-alfa e a Fractalkine, relação ainda pouco descrita tanto na infecção pelo *T. cruzi* quanto no quadro de hipertensão arterial. A correlação desses mediadores inflamatórios foram positivas para os experimentos de 1 semana e 4 semanas, ambos com apenas 1 semana de infecção. Uma hipótese para esse fato seria o tempo da infecção, ou seja, sua produção, mostrou-se maior na fase aguda da infecção (7 dias) pelo *T. cruzi* independentemente da fase do processo hipertensivo que os animais se encontravam. Lembrando que os animais do experimento de 1 semana ainda não tinham a hipertensão estabelecida enquanto que os animais do experimento de 4 semanas já apresentavam a hipertensão estabelecida. No entanto, com o passar do tempo de infecção, esta correlação tornou-se negativa.

Uma vez estabelecido que o TNF- $\alpha$  encontrava-se elevado no plasma dos animais proporcionalmente à produção de Fractalkine, tanto no início da infecção pelo *T. cruzi* quanto no início da hipertensão arterial, o próximo questionamento seria o reflexo desses mediadores inflamatórios no tecido cardíaco. Sabe-se que a fractalkine funciona como uma quimiocina angiogênica, ou seja, ela é capaz de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, crítica para a progressão do foco inflamatório (Ryu *et al*, 2008). Talvez por isso o número de vasos nos animais hipertensos tenha se mantido estável enquanto que os animais normotensos tiveram uma diminuição com o avançar da idade do animal.

Particularmente em relação ao tecido cardíaco, o processo inflamatório presente neste sítio é descrito em associação à infecção pelo *T. cruzi*. A presença do parasito na fase crônica em quantidade desproporcional a intensidade do infiltrado inflamatório fez com que se acreditasse que a gênese do infiltrado inflamatório fosse consequência de componentes autoimunes. No entanto, técnicas mais sensíveis de detecção de DNA ou de antígenos parasitários têm permitido observar correlações positivas entre o número de parasitos e a gravidade da doença cardíaca e digestiva em pacientes (Jones, *et al.*, 1993; Higuchi, *et al.*, 1993; Vago, *et al.*, 1996; Golgher & Gazzinelli, 2004) Este infiltrado inflamatório parece ser crucial para a lesão do tecido, a formação de fibrose e o desenvolvimento de alterações eletro e eco cardiográficas (Teixeira *et al*, 2001; Paula Costa *et al*, 2010; Melo *et al*, 2011). No entanto o padrão inflamatório observado em nosso estudo não condiz em magnitude e nem mesmo na quantificação de ninhos de amastigotas destes achados, provavelmente pela resistência do modelo utilizado.

## 6. - CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados utilizando o modelo de infecção pelo *T. cruzi* e hipertensão induzida pela cirurgia renovascular em ratos wistar, concluímos que o aumento da angiotensina plasmática, bem como da pressão arterial, ocorreu na 1ª e a partir da 3ª semana, respectivamente, mas de forma dependente da infecção pelo *T. cruzi*. A presença do *T. cruzi* desencadeou, ainda, um aumento dos mediadores inflamatórios TNF-alfa e Fractalkine e, em alguns momentos da infecção, houve elevação associada à cirurgia renovascular. Mesmo não se observando associação com aumento de infiltrado inflamatório e ninhos de amastigota no tecido cardíaco (uma característica intrínseca do modelo utilizado), acredita-se que, em outros modelos experimentais, a associação das duas doenças inflamatórias possa contribuir para uma piora do quadro patológico cardiovascular.

## 7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abel, L.C.; Rizzo L.V.; Ianni B.; Albuquerque F.; Bacal F.; Carrara D., Bocchi E.A.; Teixeira H.C.; Mady C.; Kalil J.; Cunha-Neto E. (2001) Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 17 (1): 99-107
2. Aliberti J.C.S., Machado F.S., Souto J.T., Campanelli A.P., Teixeira M.M., Gazzinelli R.T., Silva J.S. (1999)  $\beta$ -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 67(9):4819-4826.
3. Andrade, S.G.; Andrade, Z.A. (1966). Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach (estudo experimental em camundongos). *Ver Inst Med Trop São Paulo* 8(5):219-24.
4. Andrade, S.G.; Andrade, Z.A. (1968). Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Ver Inst Med Trop São Paulo* 10(3):180-7.
5. Ardaillou R. (1999) Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*, v. 10, suppl. 11, p. S30-S39
6. Barbosa J.B., Silva A.A.M. da, Santos A.M. dos, Júnior M.F.C., Barbosa M.M., Barbosa M.M., Neto J.A.F., Soares N.J.S., Nina V.J.S., Barbosa J.N. (2008). Prevalência da Hipertensão Arterial em Adultos e Fatores Associados em São Luís – MA. *Sociedade Brasileira de cardiologia. Arq Bras Cardiol*; 91(4):236-242
7. Barrett M.P. Burchmore R.J., Stich A., Lazzari J.O., Frasc A.C., Cazzulo J., Krishna S. (2003) The tripanosomíases. *Lancet*, 362, 1469-1480.
8. Basombrio M. A. (1981). Resistencia a re-infecciones por el *Trypanosoma cruzi* em ratones chagásicos. Departamento de Leucemia Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, 41 (supl.): 230-232
9. Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, Danser AH. (2004). Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 109: 2296-2301

10. Batlouni M. (2001). Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens* 8: 328-38
11. Bazan J.F., Bacon K.B., Wang W., Soo K., Rossi D, Greaves D.R, Zlotnik A., Schall T.J. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 13;385(6617):640-4.
12. Benter IF, Ferrario CM, Morris M, Diz DI. (1995) Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 269 (1 Pt 2):H313-9.
13. Boos C. J and Lip G.Y.H (2006). Is Hypertension an Inflammatory Process? *Current Pharmaceutical Design*, 2006, 12, 1623-1635
14. Brener Z. (1965) Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 59, 19-26.
15. Brener Z. (1969) The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann.Trop.Med.Parasitol*. 63, 215-220.
16. Brener Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol*. 27, 347-382.
17. Brener, Z. (1987) Intraspecific variation in "Trypanosoma cruzi": two types of parasite populations presenting distinct characteristics. Washington, D.C., Pan American Health Organization (PAHO - Scient Publ). 347. 11-21.
18. Brener, Z. (1984) Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79, 149-155.
19. Brener Z. (1987) Laboratory-acquired Chagas disease: comment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 81, 527
20. Brody M. J., Varner K. J., Vasquez E. C. E Lewis S. J. (1991) Central nervous system and the pathogenesis of hypertension. Sites and mechanisms. *Hypertension*. 18 (suppl. 5): III7-12
21. Burleigh, B.A., Woolsey, A.M., (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*. 4, 701\_711.

22. Cabral, P.C.; Melo, A.M.de C.A.; Amado, T.C.F; Santos, R.M. de A. B dos (2003) Avaliação antropométrica e dietética de hipertensos atendidos em ambulatório de um hospital universitário / Anthropometric and dietetic evaluation of hypertensive outpatients from a university hospital. Rev. De Nutrição. 16(1):61-71
23. Caldas, I.S. ; Talvani, A. ; Caldas, S. ; Carneiro, C.M. ; Lana, M De ; Matta P.M. Da ; Bahia, M.T., (2008) Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but not prevents chronic cardiac alterations. Parasitology Research, 1, 1
24. Campagnole-Santos, M. J.; Haibara, A. S. (2001) Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. Revista Brasileira de Hipertensão, 8, (1), 30-40
25. Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT. (2004) Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. J Immunol. 172:1711-8.
26. Cangussu, Luíza Michelle. Efeitos cardiovasculares induzidos por antagonistas angiotensinérgicos no bulbo ventrolateral de ratos com hipertensão renovascular [manuscrito]/ Cangussu, Luíza Michelle – 2008
27. Carneiro, G.; Faria, A.N; Ribeiro F., Fernando F., Guimaraes. A., Lerário, D.; Ferreira, S.R.G; Zanella, M.T. (2003). Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos / Influence of body fat distribution on the prevalence of arterial hypertension and other cardiovascular risk factors in obese patients. Rev. Assoc. Med. Bras. (1992);49(3):306-311.
28. Castagnino, H.E.; Cicco, J.A.; Fauth, M.; Thompson, A.C. (1978). Miocardiopatia embolígena en la enfermedad de Chagas Medicina (B. Aires) 38:35-39.
29. Cervenka L., Horáček V., Vaneckova, Hubáček J.Á., Oliverio M.I., Coffman T.M., Navar L.G. (2002). Essential Role of AT1A Receptor in the Development of 2K1C Hypertension. Hypertension. 40: 735-741.
30. Chandrasekar B., Mummidi S., Perla R.P., Bysani S., Dulin N.O., Liu F., Melby P.C. (2003) Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-

- dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem. J.* 373, 547–558
31. Clark MA, Diz DI, Tallant EA. (2001) Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type I receptor in vascular smooth cells. *Hypertension* 37: 1141-1146.
  32. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. (2009) Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 04 Suppl 1:252-8.
  33. De Gasparo M., Catt K.j., Inagami T., Wright J.W., Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 415–472.
  34. De Souza, W. (1984) Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol*, 86, 197 – 283.
  35. Deddish P.A., Marcic B., Jackman H.L., Wang H.Z., Skidgel R.A., Erdos E.G. (1998) N domain specific substrate and C- domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and Keto-ACE. *Hypertension* 31: 912-917,
  36. DeForrest J.M., Knappenberger R.C., Antonaccio M.J., Ferrone R.A., Creekmore J.S. (1982). Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. *Am J Cardiol.* 49:1515-1517.
  37. Dias da Silva, V.J.; Machado, C.R.A.; Ramirez, L.E.; Chapadeiro, E.; Salgado, H.C. (1999). Time course of arterial pressure and its variability in spontaneously hypertensive rats inoculated with *T. cruzi*. *Hypertension* 33, 1275.
  38. Dias E. Laranja F.S., Miranda A. & Nobrega G. (1956) Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 14, 1035-1060.
  39. Dias, J.C.P. & Brener, Z. (1984) Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79(Suppl.), 139-147.
  40. Dias J.C. (1992) Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.S., Rassi, A. (eds), Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brasil 1992, São Paulo 49-80



41. Dias, J. C. (2007).. “Southern cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives.” Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102 Suppl 1: 11-8
42. Dias J.C., Prata,A., Correia, D. (2008) Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41, 193-196.
43. Dias J.C. (2009) Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 Suppl 1, 41-45.
44. Dostal David E., Kenneth M. Baker. (1999) The Cardiac Renin-AngiotensinSystem Conceptual, or a Regulator of Cardiac Function? Circulation. Research. 85:643-650.
45. Elliot, J.P.; Hageman, J.H.; Szilagyi, D.E.; Ramakrischnan, V.; Bravo, J.J.; Smith, R.F. (1980). Arterial embolization: problems of source, multiplicity, recurrence and delayed treatment. Surgery 88:833-844.
46. Epting, L. C., Coates, M. B., Engman. M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion *T. cruzi*. Parasitology. 126,283-291.
47. Ferreira, R.C. Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. (2003) Increased plasma levels of tumor necrosis fator-alpha in asymptomatic/”indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients. Memórias do Instituto Oswaldo cruz. 98 (3): 407-11
48. Fong A.M., Robinson L.A., Steeber D.A., Tedder T.F., Yoshie O., Imai T., Patel D.D.(1998).Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. J Exp Med. 188(8):1413-9.
49. Galvão da Silva A. P; Jacysyn J.F; Abrahamsohn I. (2003) Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T-helper type 2 response. Immunology., England, 108, 230-237
50. Gea, S., Ordonez, P., Cerban, F., Iosa, D., Chizzolini, C., Vottero-Cima, E. (1993). Chagas disease cardioneuropathy: association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. Am J Trop Med Hyg. 49:581-8

51. Goldblatt H., Lynch J., Hanzal R. F., Summerville W. W. (1934) Studies on experimental hypertension: I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 59: 347.
52. Golgher, D., Gazzinelli, R.T. (2004) Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, 37 (5), 399-409
53. Gomes F., Telo D.F., Souza H.P., Nicolau J.C., Halpern A., Serrano Jr. C.V. (2010) Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.94.
54. Gomes, M. L., M. J. O. Toledo, C. V. Nakamura, N. L. R. Bittencourt, E. Chiari, and S. Marques-Araújo (2003) *Trypanosoma cruzi*: genetic group with peculiar biochemical and biological behavior. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 49-654
55. Guan S., Fox J., Mitchell K.D. Navar L.G. (1992) Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two- kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 20:763-767
56. Guariento, M.A.; Ramos, M.C.; Gontijo, J.A.R.; Carvalho, S.S. (1993). Doença de Chagas e Hipertensão Arterial Primária. *Arq. Bras. Cardiol.* 60,71-75
57. Guedes PM, Veloso VM, Talvani A, Diniz LF, Caldas IS, Do-Valle-Matta MA, Santiago-Silva J, Chiari E, Galvão LM, Silva JS, Bahia MT. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 138:106-13.
58. Guyton & Hall. *Tratado de fisiologia Médica*/John E. Hall. 12. Ed. –Rio de Janeiro: Elsevier, 2011
59. Guyton A. C. *Fisiologia Humana* 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1985
60. Guyton, A.C., Hall, J.E. *Tratado De Fisiologia Médica* 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002
61. Handa RK, Handa SE, Elgemark MK. (2001) Autoradiographic analysis and regulation of angiotensin receptor subtypes AT (4), AT (1) and AT (1-7) in the kidney. *Am.J. Physiol.* 281: F936-F947.
62. Higuchi, M.L.; De Brito, T.; Reis, M.M.; Barbosa, A.; Bellotti, G.; Pereira-Barreto, A.C.; Pileggi, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and

- myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.*, 2, 101-106, 1993
63. Horacek M., Möhlenkamp S., Mahabadi A.A., Churzidse S., Moebus S., Jöckel K.H., Erbel R. (2012). Prävalenz der arteriellen Hypertonie in der westdeutschen Bevölkerung: Heinz Nixdorf Recall Studie. *Herz*: 37:721–727
64. Ibrahim J., Berk B.C. & Hughes A.D. (2006) Comparison of simultaneous measurements of blood pressure by tail-cuff and carotid arterial methods in conscious spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clin.Exp.Hypertens.* 28, 57-72.
65. Irigoyen M.C., Consolim-Colombo F.M., Krieger E.M. (2001) Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Ver Bras Hipertensão* 8: 55-62
66. Jones, E.M.; Colley, D.G.; Toste, S.; Lopes, E.R.; Vnencak-Jones, C.L.; Mccurley, T.L. (1993) Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 348-357.
67. Kaplan, N.M. (2001). Hypertensive and atherosclerotic cardiovascular disease: systemic hypertension-mechanisms and diagnosis. In: Braunwald, E; Zipes, DP; Libby, P. (Eds), *Heart Disease – A Textbook of Cardiovascular Medicine*. H.I.E. Saunders Press, Chicago. p.941-958.
68. Kasal D.A.B. and Neves M.F. (2011). Inflamação como mecanismo patogênico na hipertensão arterial. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ*
69. Koren, M.J.; Devereux, R. B., Casale, P.N., Savage, D. D., Laragh, J.H. (1991) Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Annals of Internal Medicine*, 114, ed 5, 345-352.
70. Krege J.H., Hodgin J.B., Hagaman J.R. & Smithies O. (1995) A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*. 25, 1111-1115.

71. Krettli, A.U & Lima Pereira F.E. (1981): Immunosuppression in protozoan infection, *Biochemistry and Physiology of protozoan*. In: Levandoviski, M. & Hutner, S.H. (Org) 2ed (new York Academic Press) 4: 431-461
72. Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczko W. (2002) Antitrombotic effect of captopril and losartan is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 40 (5):774-9.
73. Kusserow H., Unger T. (2004) Vasoactive peptides, their receptors and drug development. *Basic & Clinical Pharmacology & toxicology*, 94:5-12.
74. Lazartigues E.; Lawrence A.J.; Lamb F.S.; Davisson R.L. (2004) Renovascular hypertension in mice with brain-selective overexpression of AT1a receptors is buffered by increased nitric oxide production in the periphery. *Circulation Research*. 95:523-531
75. Lemos VS, Cortes SF, Silva DM, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. (2002) Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of the phenylephrine-induced contraction in the aorta mREN-2 transgenic rats. *Br. J Pharmacol* 135(7):1743-8.
76. Li J.; Doerffel Y.; Hocher B.; Unger T. (2007) Inflammation in the genesis of hypertension and its complications—the role of angiotensin II. *Nephrol Dial Transplant* (2007) 22: 3107–3109
77. Lolio C.A. (1990). *Epidemiologia da Hipertensão Arterial*. *Rev. Saúde pública*. São Paulo, 24(5): 425-32
78. Machado R.D., Santos R.A., Andrade S.P. (2000) Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci*. 66(1):67-76,
79. Manual de orientação clínica: hipertensão arterial sistêmica (HAS). (2011) Aparecida Teruko Tominaga Yamada; Carmen Lavras e Maris Salette Demuner (orgs). São Paulo: SES/SP,
80. Martinez-Maldonado M. (1991) Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 17, 707-719.

81. Martins, Régia Ferreira. Interferência da dieta hipoproteica na síntese de CX3CL1/fractalkine e endotelina em modelo experimental de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* [manuscrito]/Régia Ferreira Martins - 2010
82. Melo L., Caldas I.S., Azevedo M.A., Gonçalves K.R., Nascimento A.F. da S., Figueiredo V.P., Diniz L.F., Lima W.G. de, Torres R.M., Bahia M.T. Talvani A. (2011). Low Doses of Simvastatin Therapy Ameliorate Cardiac Inflammatory Remodeling in *Trypanosoma cruzi* -Infected Dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 84(2), 2011, pp. 325–331
83. Melo S.E.S.F.C, Yugar-Toledo J.C., Coca A.P., Júnior H.M. (2007). Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo – Artigo de revisão. *Rev Bras Hipertens* vol.14(4): 234-238
84. Molina M.C.B., Cunha R. de S., Herkenhoff L.F., Mil J.G. (2003). Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. *Rev Saúde Pública* 2003;37(6):743-50
85. Navar L.G., Zou L., Thun A.V., Wang C.T., Imig J.D., Mitchell K.D. (1998) Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol. Sci.* 13, 170-176.
86. Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. (2009) Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis* 2009; 15: 653-655.
87. Nunes A.P de O.B, Rios A.C. dos S, Cunha G.S. da, Barretto A.C.P., Negrão C.E. (2006) Efeitos de um Programa de Exercício Físico Não Supervisionado e Acompanhado a Distância, Via Internet, sobre a Pressão Arterial e Composição Corporal em Indivíduos Normotensos e Pré-Hipertensos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* - 86, 4
88. O'Garra A., Murphy K. (1994) Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current Opinion in Immunology.* 6, ed 3, 458–466
89. Olivetti, G.; Cigola, E.; Maestri, R., Lagrasta, C.; Corradi, D.; Quaini, F. (2000) Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 45, ed. 1, 68 - 75.

90. Palmero, H.A.; Caiero, T.F.; Iosa, D.J. (1980). Distinctive abnormal responses to tilting test in chronic Chagas disease. *Klin. Wochenschr.* 58, 1307-1311.
91. Palmero, H.A.; Caiero, T.F.; Iosa, D.J. (1985). Effect of Chagas disease on arterial blood pressure. *Am. Heart J.* 97, 38-42.
92. Paula Costa G. de, Silva R.R., Pedrosa M.C., Pinho V., Lima W.G., Teixeira M.M., Bahia M.T., Talvani A. (2010) Enalapril prevents cardiac immune-mediated damage and exerts anti-*Trypanosoma cruzi* activity during acute phase of experimental Chagas disease. *Parasite Immunology*, 2010, 32, 202–208
93. Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH. (2002). Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res.* 91: 1119-26.
94. Penna, A. L. *et al* (2005). Manual de vigilância epidemiológica/Secretaria de Saúde
95. Rajendran S, Chirkov YY, Campbell DJ, Horowitz JD. (2005). Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol* 46(4):459-463.
96. Rebêlo, J.M.M.; Barros, V.L.P e Mendes, W.A. (1998). Espécies de Triatominae (Hemiptera: reduviidae) do Maranhão, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 14 (1), 187-192
97. Ribeirão, M.; Lúcia, V.; Ferguson, P.C.; Rénia, L.; Fragata Filho A.A.; Schenkman, S. e Rodrigues, M.M. (2000) Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 22 (1): 49-53
98. Ribeiro dos Santos, R., Hudson, L. (1980). Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol*, 44:349-54.
99. Rocha M.O. Teixeira, M.M.; Ribeiro, A.L. (2007). An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev. Anti Infect.*; 5 (4): 727-743
100. Rodrigues M.C., Campagnole-Santos M.J., Machado R.P., Silva M.E., Rocha J.L.M., Ferreira P.M., Santos R.A.S., Alzamora A.C. (2007). Evidence for a role of AT2 receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-

- intensity physical activity in renovascular hypertensive rats. Elsevier, Peptides 28 1375–1382
101. Ryu J, Lee C.W., Hong K.H., Shin J.A., Lim S.H., Park C.S., Shim J, Nam K.B., Choi K.J., Kim Y.H., Han K.H. (2008). Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res.* 78(2):333-40.
  102. Salgado C.M., Carvalhaes J.T.A. (2003). Hipertensão arterial na infância – Artigo de revisão. *Jornal de pediatria:* 79 (Supl.1):S115-S124
  103. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 28;91(1-3):45-62.
  104. Schober A. Chemokines in Vascular Dysfunction and Remodeling (2008). *Arterioscler Thromb Vasc Biol;* 28;1950-1959
  105. Sher A.; Gazzinelli R.T.; Oswald I.P.; Clerici M.; Kullberg M.; Pearce E.J.; *et al.* (1992) Role of T cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection, *Immunol Rev.* 127: 183-204.
  106. Sigmon D.H. & Beierwaltes W.H. (1993). Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension. *Hypertension.* 22, 237-242.
  107. Silva, J.S; Vespa, G.N; Cardoso M.A; Aliberti J.C.; Cunha F. Q. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infection and Immunity.*, United States, 63, 4862-4867.
  108. Silveira, A. C.; Feitosa, V. R. & Borges, R. (1984). Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais,* 36:15-312
  109. Simões E Silva A.C., Baracho N.C., Passaglio K.T., Santos R.A.S. (1997). Renal actions of angiotensin-(1–7). *Braz J Med Biol Res.* 30: 503–513.
  110. Souza C.N., Breda L.C.D., Aguiar C.F., Custódio F.B., Machado J.R., Abate D.T.R. e S., Llaguno M.M., Reis M.A. dos, Faleiros A.N.G. (2010). Análise clínica e quantificação da fibrose renal e cardíaca em pacientes hipertensos com ou sem acidente vascular encefálico. *Rev Bras Hipertens* 17 (2):87-91

111. Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV, Murta SM, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT (2000). Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 2(8):851-66
112. Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. (2004) Chemokine Receptor Expression on the Surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chagas Disease. *Infect Dis. Jan 15;189(2):214-20*
113. Talvani A., Teixeira M.M. (2011) Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. *Adv Parasitol. 76:171-94.*
114. Talvani A., Rocha M.O.C, Barcelos L.S., Gomes Y.M., Ribeiro A.L., Teixeira M.M. (2012) Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Chagasic Cardiomyopathy. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38:943–50
115. Tanowitz H.B., Kirchhoff L.V., Simon D., Morris S.A., Weiss L.M e Wittner M. (1992) Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5 (4) 400-419
116. Tarleton R.L., Grusby M.J., Postan M., Glimcher L.H. (1996) *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *International Immunology*, 8, (1), 13-22
117. Teixeira M.M., Talvani A., Tafuri W.L., Lukacs N.W, Hellewell P.G. (2001). Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 69
118. Teixeira, M.M. Gazzinelli R.T. e Silva J.S. (2002). Chemokines, inflammations and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology*; 18 (6): 262-265
119. Torrico , F; Heremans H.; Rivera M.T; Van M.E; Billiau A.; Carlier Y. (1991) Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of immunology.*, United States, 146, 3626-2632
120. Tyler, K.M.; Engman, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 472-81



121. Ulbrich A.Z., Bertin R.L, Bozza R., Neto A.S., Lima G.Z.S., Carvalho T., Campos W. de. (2012). Probabilidade de hipertensão arterial a partir de indicadores antropométricos em adultos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 56, 6
122. Vago, A.R.; Macedo, A.M.; Adad, S.J.; Reis, D.D.; Correa-Oliveira, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 348, 891-892, 1996.
123. WHO, 2002. Expert committee (2002). Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep 905:109
124. WHO, 2003 OMS Informações sobre Drogas 17, (4), 2003
125. WHO 2010, Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases 2010.
126. Wright, I.S. (1974). Pulmonary embolism: a most undiagnosed and untreated disorder *J Am Geriatr Soc*, 22:433-439.
127. Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 78, 1, 87-11
128. Yoshida, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity, *Parasitol, Int*, 57, 105-109.
129. Zhang J. e Patel J.M. (2010) Role of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chronic inflammatory lung diseases-Review Article. *Int J Clin Exp Med*; 3(3):233-244
130. Zhong Jian Cheng, Heikki Vapaatalo, Eero Mervaala. (2005) Angiotensin II and vascular inflammation. *Med. Sci. Monit* 11(6): RA194-205.
131. Zhuo J., Moeller I., Jenkins T., Chai S.Y., Allen A.M., Oshiri M., Mendelsohn F.A.O. (1998) Mapping tissue angiotensin converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hyp.* 16, 2027–2037