

Francisca Hildemagna Guedes da Silva

Mestrado em Ciências Biológicas/NUPEB (defesa:08/03/12)

Linha de pesquisa: Imunobiologia de Protozoários

Título: Avaliação da angiogênese inflamatória em camundongos induzida por antígenos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto/MG

31/10/12

S586a Silva, Francisca Hildemagna Guedes da.

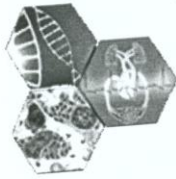
Avaliação da angiogênese inflamatória em camundongos induzida por antígenos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Francisca Hildemagna Guedes da Silva - 2012.

61 f.: il. color.; grafs.

Orientador: Prof. Dr. André Talvani Pedrosa da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de

Catlogação: sisbin@sisbin.ufop.br



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

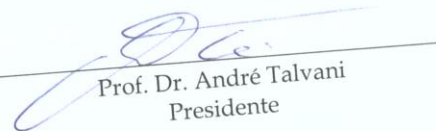


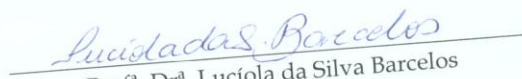
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

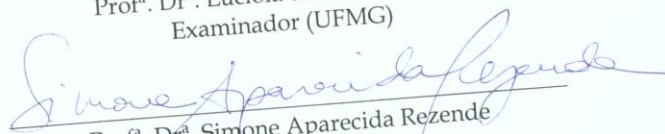
“Avaliação da Angiogênese Inflamatória em Camundongos Induzida por Antígenos da Cepa Y do *Trypanosoma cruzi*”

Aos oito dias do mês de março de 2012, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Francisca Hildemagna Guedes da Silva**. 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 APROVAR 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.ª Dr.ª Lucíola da Silva Barcelos
Examinador (UFMG)


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

DATA DA DEFESA: 08/03/2012

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

**Avaliação da angiogênese inflamatória em
camundongos induzida por antígenos da cepa Y do
Trypanosoma cruzi.**

FRANCISCA HILDEMAGNA GUEDES DA SILVA

Ouro Preto

2012

FRANCISCA HILDEMAGNA GUEDES DA SILVA

**Avaliação da angiogênese inflamatória em
camundongos induzida por antígenos da cepa Y
do *Trypanosoma cruzi*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários

Orientador: Professor Doutor André Talvani
Pedrosa da Silva

Ouro Preto

2012

Página com as assinaturas dos membros da banca examinadora, fornecida pelo
Colegiado do Programa

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Doença de Chagas do Departamento de Ciências Biológicas, no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

Colaboradores:

Professora Dra. Maria Terezinha Bahia (Laboratório de doença de Chagas - UFOP)

Professora Dra. Silvia Passos de Andrade (Laboratório de Angiogênese – UFMG)

Professora Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura (Laboratório de Imunoparasitologia – UFOP)

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, Twas

Vence quem persevera

Se não dessa vez, da próxima!

Dedico este trabalho a TODOS que me auxiliaram ao longo de toda a minha vida, para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

- À Deus por ser a força maior que me concede tantas graças, e por me fazer apaixonada pela vida.
- A minha família pelo suporte amoroso, apoio e incentivo. À minha querida mamãe que estará sempre comigo no pensamento e coração.
- Ao meu querido orientador André Talvani por ser um “espelho” em minha carreira acadêmica, por está sempre disponível a ajudar, a ensinar com paciência e carinho e por me conceder a oportunidade de desenvolver esse trabalho.
- À querida Maria Terezinha Bahia por nos auxiliar sempre e por ser uma pessoa extremamente admirável e competente.
- Aos demais professores do laboratório, Marta de Lana e Evandro Machado pela convivência harmoniosa.
- À professora Silvia Passos de Andrade e ao Laboratório de Angiogênese da Universidade Federal de Minas Gerais, pela parceria e atenção.
- À professora Sandra Aparecida de Lima Moura por sua disponibilidade, carinho e atenção.
- À todos os colegas do laboratório de doença de Chagas em especial aos meus amigos lindos Maíra, Tassiane, Vivian, Maykon e Guilherme por desbravarem comigo os desafios do mestrado. E ainda, ao Ivo, Livia e Isabel por serem meus professores na bancada e a Deena pela colaboração.

- Aos queridos amigos do curso de mestrado, em especial Gabriela, Kelvinson, Gleise pelos bons momentos que compartilhamos.
- As Técnicas do laboratório Ana Salomé, Ludmilla e Dani por nos auxiliarem.
- As amigas da República Bem-te-vi por me concederem momentos felizes e de grande aprendizado.
- A todos aqueles que por algum motivo me falham à memória nesse momento, mas fizeram parte direta ou indiretamente desta etapa me apoiando e torcendo por mim.

TOCANDO EM FRENTE

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei

Conhecer as manhas
E as manhãs
O sabor das massas
E das maçãs

É preciso amor
Pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
E ir tocando em frente

Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou...

Todo mundo ama um dia,
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora

Cada um de nós compõe a sua historia
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz...

Resumo

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, possui proteínas de superfície ou glicoproteínas, como a GPI-mucina que se liga a receptores primitivos *Toll like* de células fagocíticas desencadeando a ativação de fatores de transcrição responsáveis pela produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios que participam efetivamente da resposta inflamatória ativando e recrutando células imunes para o sítio inflamatório auxiliando no controle da replicação parasitária. A neovascularização é um mecanismo necessário durante o processo inflamatório, tanto para o fornecimento de nutrientes quanto para o aumento do recrutamento celular no sítio em questão. Neste estudo, avaliamos a angiogênese inflamatória induzida por implantes sintéticos, alojados no espaço subcutâneo em camundongos e estimulados, 24 horas pós-implante, com antígenos de 10^8 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*. Os implantes foram retirados nos dias 1, 4, 7 e 14 pós-implantes para análise bioquímica (hemoglobina, enzima mieloperoxidase, enzima N-acetil-b-Dglicosaminidase), imunológica (citocinas e quimiocinas) e avaliação histológica. Foi observado que os antígenos do *T. cruzi* elevaram os níveis de mediadores inflamatórios (TNF-alfa, CCL2, CCL5) e pró-angiogênicos (VEGF) no 7º dia pós-implante e o aumento do conteúdo de hemoglobina no 14º dia pós-implante. Além disso, observou-se aumento do infiltrado de monócitos no 7º dia pós-implante, provavelmente responsável pela angiogênese descrita no 14º dia, sendo estes dados confirmados pela análise histológicas dos implantes. O infiltrado de neutrófilos e a deposição de colágeno não foram alterados com o estímulo dos antígenos nos dias avaliados. Os resultados obtidos através deste estudo sugerem que os antígenos do *T. cruzi* (cepa Y) atuaram como um agente angiogênico (angiogênese inflamatória) no modelo de esponja subcutânea. Novas perspectivas de estudos esclarecerão se este padrão de angiogênese observado é reprodutível no sítio cardíaco e, se o mesmo é dependente da cepa do *T. cruzi* utilizada.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, antígenos, angiogênese, inflamação

Abstract

Acute inflammatory cells (granulocytes, macrophages, endothelial cells and fibroblasts) ordinarily lead to the resolution of a series of events promoting maintenance of local tissue. Angiogenesis and inflammation are persistent features of several pathological conditions induced by pathological agents. Particularly, glycoproteins derived from the protozoan *Trypanosoma cruzi* are suggested to induce this inflammatory angiogenesis. In this study, we investigated the effects of total antigen from 10^8 trypomastigote forms of *T. cruzi* (Y strain), inoculated in sponge implants of mice, on angiogenesis, inflammatory cell pattern and endogenous production of inflammatory and angiogenic mediators on days 1, 4, 7 and 14 post implant. There was an elevation of hemoglobin content on the 14th day, assessed by hemoglobin of the implants, but with no difference between those sponges stimulated with *T. cruzi* antigen or vehicle (PBS). However, parasite antigens induced high production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory mediators TNF- α , CCL2 and CCL5 on the 7th day in sponges when compared to the unstimulated group. Accumulation of neutrophils and macrophages was determined by measuring of myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl-b-D-glucosaminidase (NAG) enzymes activity, respectively. MPO activity was unaffected by *T. cruzi* antigen, but macrophage accumulation was increased after stimulation with antigens initiating at day 4 and peaking at day 7. Morphometric analysis of the sponges suggested that inflammatory and angiogenic mediators, particularly induced by macrophages, increased blood vascularization in the matrix of the sponges peaking at 14th day. Together, our results suggest that *T. cruzi* molecules are the pivotal reason to the magnification of inflammatory angiogenesis in the sponge model and this process might be triggered by *T. cruzi*-induced inflammatory mediators.

Key words: angiogenesis, inflammation, *Trypanosoma cruzi*, antigen

Lista de figuras

Figura 1 – Etapas da angiogênese.....	6
Figura 2 – Esponja de poliéster-poliuretano.....	18
Figura 3 – Avaliação da angiogênese.....	24
Figura 4 – Avaliação da inflamação.....	26
Figura 5 – Formação da matriz extracelular e deposição de colágeno.....	27
Figura 6 – Avaliação dos mediadores inflamatórios.....	28

Figura 7 – Avaliação histológica dos implantes subcutâneos.....31

Figura 8 – Esquema representativo do recrutamento celular e formação neovascular nos implantes subcutâneo.....38

Lista de abreviaturas

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF- Fator de crescimento transformante

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

MEC – Matriz extracelular

TLR – Receptores *Toll Like*

NF-kB – Fator nuclear kB

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

NOD – Domínio oligomerização ligados a nucleotídeos

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

MCP – Proteína quimioatrativa de monócitos

TNF – Fator de necrose tumoral

IL – Interleucina

HGF – Fator de crescimento de hepatócito

VEGFR – Receptor para fator de crescimento endotelial vascular

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

MEM – *Minimum essential medium*

HE – Hematoxilina-eosina

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

MPO – Mieloperoxidase

NAG – N-acetil- β -d-glicosaminidase

Ph – Potencial hidrogeniônico

HTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

DMSO – Dimetilsulfóxido

INF – Interferon

OD – Densidade óptica

SEM – Erro padrão da média

Sumário

	Pag.
1 Introdução.....	1
1.1 Inflamação.....	1
1.2 Angiogênese.....	3
1.3 Modelos experimentais para o estudo da angiogênese.....	7
1.3.1 Modelo de implante subcutâneo de esponjas.....	8
1.4 Angiogênese inflamatória induzida pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.5 Mediadores angiogênicos e inflamatórios.....	11
1.5.1 Fator de crescimento endotelial vascular.....	13
2 Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 Materiais e métodos.....	16
3.1 Animais.....	16
3.2 Protocolo experimental.....	16
3.3 Antígenos do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
3.4 Técnica de implantação da esponja.....	16
3.5 Remoção dos implantes.....	18
3.6 Avaliação histológica dos implantes de esponja.....	19

3.7 Avaliação da angiogênese e da infiltração tecidual.....	20
3.7.1 Dosagem de hemoglobina.....	20
3.7.2 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	20
3.7.3 Avaliação da atividade da N-acetil- β -d-glicosaminidase.....	21
3.7.4 Avaliação da deposição de colágeno.....	22
3.7.5 Avaliação dos mediadores inflamatórios e angiogênicos.....	22
3.7.6 Análises estatísticas.....	23
4 Resultados.....	24
4.1 Efeitos da aplicação de antígenos brutos de formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do <i>Trypanosoma cruzi</i> nos implantes das esponjas.....	24
4.1.1 Avaliação da angiogênese.....	24
4.1.2 Avaliação da inflamação.....	25
4.1.3 Formação da matriz extracelular e deposição de colágeno.....	27
4.2 Avaliação dos mediadores inflamatórios nos implantes.....	28
4.3 Avaliação histológica.....	30
5 Discussão.....	32
6 Conclusões.....	40
7 Referências bibliográficas.....	41
8 Anexo.....	55

Anexo: Prêmio Walter Colin – Sociedade Brasileira de Protozoologia

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Inflamação

A inflamação, do latim *inflammatio* (atear fogo), é reconhecida por quatro sinais e sintomas típicos da resposta à lesão, conhecidos como sinais cardinais: rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), tumor (inchaço, causado pelo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial), calor (aumento da temperatura devido às mudanças no fluxo sanguíneo e atividade metabólica de mediadores celulares da inflamação), e dor, devida em parte, a mudanças na perivasculatura e associada às terminações nervosas. Rudolf Virchow em 1850 acrescentou um quinto sinal, o *functio laesa* (perda da função dos órgãos envolvidos) (Libby, 2007).

O processo inflamatório é coordenado por moléculas pró e antiinflamatórias que regulam a quimiotaxia, migração e proliferação celular. A resposta inflamatória é um processo complexo que requer fatores e tipos celulares distintos, os quais, de forma coordenada, controlam o dano tecidual contra injúria por agentes patogênicos, traumáticos ou tóxicos. A inflamação, geralmente, termina com um processo de cicatrização. Entretanto, se esse processo não é corretamente ordenado, resulta em uma inflamação persistente (Benelli *et.al.* 2006; Charo & Ransohoff, 2006). Os fenômenos inflamatórios, tais como irritação, alterações vasculares, exsudação plasmática e celular, lesões degenerativas e necróticas, proliferação conjuntiva e vascular reparadora e modificações das células do exsudato, se apresentam em etapas, podendo superpor durante o decorrer do processo (Filho, 2006). Uma complexa rede de sinais químicos que promovem alterações vasculares e celulares faz parte da resposta inflamatória que irá iniciar e sustentar uma resposta ao dano tecidual no hospedeiro. Citocinas, histaminas e proteases provocam vasodilatação e extravasamento de líquidos, promovem adesão endotelial e recrutamento de células inflamatórias, esses mediadores inflamatórios são liberados após a injúria no tecido e ficam armazenados em mastócitos, presentes em tecidos conjuntivos ou são produzidos por outras células como monócitos,

macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células parenquimatosas (Nathan, 2002; Filho, 2006).

Esses eventos associados à vasodilatação favorecem o aumento do fluxo sanguíneo local, promovendo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquido rico em proteínas para o espaço intersticial. A perda de líquidos leva a uma hemoconcentração local, deixando o sangue mais viscoso e lento (Charo & Ransohoff, 2006). Quando a estase se desenvolve, ocorre uma orientação periférica de leucócitos, principalmente neutrófilos, ao longo do endotélio venular, processo denominado marginação leucocitária, que representa o primeiro evento das alterações celulares da resposta inflamatória (Filho, 2006; Charo & Ransohoff, 2006; Charo & Taubman, 2004, Kumar *et al.* 2010).

Os mediadores inflamatórios promovem ativação endotelial, aumentando a expressão de suas moléculas de adesão, favorecendo o recrutamento de leucócitos que rolam lentamente ao longo do endotélio vascular, processo denominado rolamento, e em seguida aderem transitoriamente ao endotélio. E quando ativados por quimiocinas, os leucócitos aumentam a avidéz de suas ligações às moléculas de adesão do endotélio e em seguida passam entre as células endoteliais adjacentes, fenômeno chamado de transmigração ou diapedese. Esses leucócitos uma vez no interstício migram em direção ao estímulo lesivo por quimiotaxia (Kumar, *et al.*, 2008, Kumar *et al.* 2010).

Os neutrófilos polimorfonucleares constituem as células predominantes do exsudado nas primeiras 24 horas após o início do processo inflamatório, apresentando meia-vida curta. (Charo & Ransohoff, 2006). Outro tipo de células inflamatórias, como os monócitos migram para o sítio inflamatório por quimiotaxia, onde se diferenciam em células dendríticas e macrófagos. Os monócitos começam a migrar dos vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a diapedese, estes se acumulam sendo as células predominantes após 48 horas (Visser *et al.*, 2006; Filho, 2006; Kumar, *et al.*, 2008).

Os macrófagos produzirão uma série de fatores de crescimento e citocinas responsáveis por uma ampla variedade de respostas em vários tipos celulares incluindo células endoteliais, células epiteliais e células de origem mesenquimal. Os macrófagos liberam substâncias biologicamente ativas que resultam na remodelação tecidual e

recrutamento de leucócitos adicionais como os linfócitos B, T CD4+ e CD8+ (citotóxicos), antígeno-específicos que irão ampliar a resposta imune (Visser *et al.*, 2006).

Dentre estas substâncias podem-se citar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, proteases, citocinas, quimiocinas, fatores de coagulação e metabólitos do ácido araquidônico (responsáveis pelo aumento do recrutamento de leucócitos) além de fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), citocinas fibrinogênicas e fatores da angiogênese, responsáveis pela formação de novos vasos (Kumar *et al.*, 2008).

A resposta inflamatória é regulada por um balanço entre fatores pró e antiinflamatórios que coexistem no sítio lesado (Tracey, 2002). O desequilíbrio desses fatores resulta no aumento da produção de proteases, proteoglicanos, mediadores lipídicos e prostaglandinas que, concomitantemente, reforçam o processo (Mrowietz & Boehncke, 2006). Como a inflamação envolve a migração e o extravasamento de células imunes através da microcirculação, o endotélio exerce papel fundamental nesse processo.

1.2 - Angiogênese

A angiogênese é um termo de origem grega (“aggeion” = vaso capilar, vaso; e “gênesis” = formação, constituição) que foi utilizado por Arthur Tremain Herting, em 1935, para descrever a neoformação de vasos sanguíneos em placentas de macacas (Ausprunk & Folkman, 1977). Posteriormente, o termo foi utilizado para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vasos pré-existentes. Atualmente, tem sido utilizado para denotar o processo de crescimento e remodelamento de uma vasculatura primitiva em um complexo vascular (Carmaliet, 2000). Dessa forma, a angiogênese é definida como crescimento de novos capilares, apresentando um complexo processo que envolve interações de vários tipos de células e mediadores para estabelecer um específico microambiente adequado, para a formação de novos capilares de vasos pré-

existentes (Kerbel & Folkman, 2002). Tal processo biológico pode ocorrer em condições fisiológicas ou patológicas, tais como, no desenvolvimento embrionário, no reparo de feridas e em algumas patologias como retinopatia diabética e tumores (Ribatti *et al.*, 2001).

Os vasos sanguíneos são formados por células endoteliais que estão em contato direto com o fluxo sanguíneo. Sob as células endoteliais encontram-se os pericitos, as células musculares lisas, a membrana basal e a matriz extracelular. A função, a composição e o fenótipo dos vasos sanguíneos variam de acordo com sua localização, com a estrutura vascular, os constituintes celulares, a membrana basal e a matriz extracelular (Rajotte *et al.*, 1998).

Nos primeiros estágios da embriogênese, o embrião se desenvolve na ausência de vascularização, recebendo sua nutrição por difusão. De maneira ordenada e sequencial, contudo, o embrião rapidamente se transforma em um organismo altamente vascularizado e sua sobrevivência depende de uma rede complexa de plexos capilares e vasos sanguíneos. Os eventos iniciais no crescimento vascular dos quais as células endoteliais precursoras (angioblastos) migram para locais distintos, diferenciam e reúnem-se em cordões endoteliais sólidos, denominado vasculogênese (Conway *et al.*, 2001). A vasculogênese é um processo dinâmico que envolve interações célula-célula e célula-matriz extracelular dirigido espacialmente e temporalmente por fatores de crescimento e outras proteínas. Este processo inclui a diferenciação de células-tronco em angioblastos mesodérmico, fator de crescimento dirigindo migração de angioblastos para formar ilhas de sangue onde os angioblastos darão origem a células endoteliais. (Adair & Montani, 2011). Portanto, a angiogênese é um processo distinto da vasculogênese, visto que, ela é a formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes.

A formação de novos vasos no indivíduo adulto ocorre a partir de vasos pré-existentes em resposta direta à demanda tecidual (Rissau, 1997). Sob condições normais, em indivíduos adultos as células endoteliais permanecem em estado de quiescência, devido o equilíbrio entre substâncias endógenas pró e anti-angiogênicas, porém, quando estimuladas adequadamente, as células endoteliais se tornam ativas e iniciam uma cascata de eventos que culminam na formação de novos vasos. O

equilíbrio de fatores pró e anti-angiogênicos pode ser rompido por fatores químicos ou físicos como injúria tissular, hipóxia e alterações do fluxo sanguíneo. (Ingber *et al.*, 1986; D'amore & Thompson, 1987, Aremberg *et al.*, 1997; Chung & Ferrara, 2010).

A primeira etapa do processo angiogênico consiste na ativação de células endoteliais originadas de vasos sanguíneos pré-existentes. Essas células ativadas liberam enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal adjacente (Mignatti & Rifkin, 1996). As células endoteliais que foram liberadas iniciam a migração em direção à matriz extracelular degradada. A etapa seguinte consiste na proliferação das células endoteliais e formação do broto capilar, que será estimulado por uma variedade de fatores de crescimento, alguns dos quais foram liberados pela própria degradação da matriz extracelular (Pettersen *et al.*, 2000; Liekens *et al.*, 2001; Dvorak *et al.*, 2003; Dvorak, 2005).

A fase final do processo angiogênico inclui a formação das “alças” capilares e a determinação da polaridade das células endoteliais, que será importante para a formação do lúmen capilar e para as interações célula-célula e célula-matriz (Bischoff, 1997). A estabilização do vaso sanguíneo neoformado é atingida após a migração de células mesenquimais ao redor dos novos vasos, e sua posterior diferenciação em pericitos ou células musculares lisas (Hirsch & D'amore, 1997). As células periendothelias são essenciais para o amadurecimento dos vasos, pois estabilizam os vasos, estimulando a produção de matriz e protegem os vasos contra a regressão (Figura 1) (Carmeliet, 2000; Veale & Fearon, 2006).

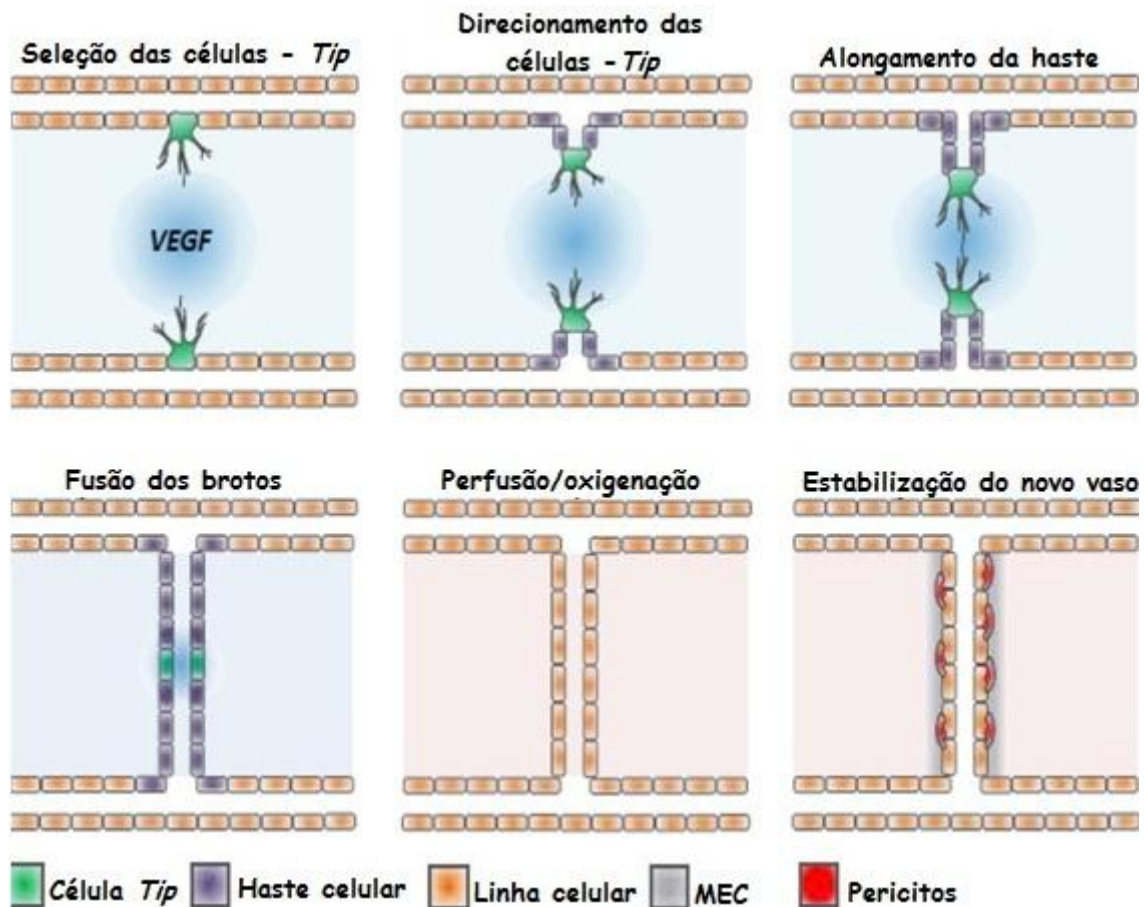


Figura 1: Etapas da angiogênese: VEGF-A direciona o crescimento de capilares nos tecidos hipóxicos. (A) As células endoteliais expostas a maior concentração de VEGF-A tornam-se células *Tip* (verde). O tecido hipóxico é indicado pelo círculo (azul). (B) As células *Tip* lideram o desenvolvimento dos brotos, estendendo numerosas filopódias. (C) Os brotos desenvolvidos se alongam pela proliferação das células endoteliais (roxo) que seguem as células *Tip*. (D) Os dois brotos se fundem e formam um lúmen. (E) O sangue flui através do capilar recém-desenvolvido, sendo estabilizado pelo recrutamento de pericitos (vermelho) e deposição da matriz extracelular (MEC). (Adaptado por Adair & Montani, 2011).

1.3 - Modelos experimentais para o estudo da angiogênese

A angiogênese pode ser avaliada qualitativa e quantitativamente por uma variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (Jain *et al.*, 1997). A maioria das etapas da cascata angiogênica pode ser monitorada *in vitro*, utilizando-se cultura de células endoteliais. Os ensaios mais utilizados são o de migração celular em câmara de Boyden (e suas variações) e o de proliferação, cujos estudos se baseiam, geralmente, na contagem celular, incorporação de timidina ou técnicas de coloração para proliferação ou morte celular (Maier *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 1999). Além disso, ensaios para o estudo de processos mais complexos baseados na dissolução de matrizes e na diferenciação de vasos (ex. formação de estruturas parecidas com tubos a partir de células endoteliais cultivadas sobre géis de colágeno ou fibrina) também são utilizados (Bischoff, 1995; Folkman & Haudenschild, 1980). Entretanto, apesar da grande contribuição na identificação de moléculas que estimulam ou inibem essas etapas da angiogênese, nestes ensaios *in vitro*, as células endoteliais precisam ser removidas dos seus microambientes naturais, podendo ter as suas propriedades fisiológicas alteradas (Griffioen & Molema, 2000).

No caso dos modelos *in vivo*, estes geralmente fornecem informações mais quantitativas. Dentre esses modelos, os mais utilizados são as câmaras transparentes em roedores (orelha de coelho, dorso de camundongo, bochecha de hamster e câmaras cranianas); as preparações teciduais exteriorizadas, cuja mais utilizada é a da membrana corioalantóica de embriões de galinha. As preparações *in situ*, das quais os principais modelos são a córnea de roedores, as bolsas de ar subcutâneas, a cicatrização de feridas cutâneas e a isquemia coronariana e de membros inferiores, além dos modelos de implantes de matrizes de polímeros biocompatíveis, os quais permitem o estudo da contribuição relativa de processos inflamatórios precedentes (Carmeliet *et al.*, 1998; Engelhardt *et al.*, 1998; Jain *et al.*, 1997; Colville-Nash *et al.*, 1995; Roesel & Nanney, 1995; Andrade *et al.*, 1987). Adicionalmente, o implante de esponjas sintéticas em camundongos é um modelo bem estabelecido na literatura para o estudo da angiogênese inflamatória. (Barcelos, *et al.*, 2004, Moura *et al.*, 2010).

1.3.1 - Modelo de implante subcutâneo de esponjas

O modelo de implantação subcutânea de matrizes esponjosas em animais foi inicialmente descrito por Grindlay & Waugh (1951) e modificado por Andrade e colaboradores, em 1987. Neste estudo, esponjas de poliéster-poliuretano foram utilizadas como matriz para o crescimento dos vasos sanguíneos. O modelo de implantes também já foi utilizado para avaliar o efeito inflamatório e angiogênico de drogas sintéticas, como atorvastatina e sinvastatina, entre outras (Araújo *et al.* 2010). A implantação de matriz sintética induz um processo inflamatório com uma conseqüente formação de tecido rico de vasos sanguíneos, apresentando-se um excelente modelo para o estudo da angiogênese inflamatória.

A matriz implantada induz uma reação inflamatória tipo corpo estranho, com a formação de tecido de granulação rico em células inflamatórias, novos vasos sanguíneos e matriz extracelular, sendo envolvido por uma cápsula fibrosa (Mendes, *et al.* 2007, Grindlay & Waugh, 1951). A utilização de implantes de esponjas permite o estudo do infiltrado inflamatório, da angiogênese e da deposição da matriz extracelular, bem como o efeito de drogas ou outro estímulo sobre o processo (Bailey, 1988; Andrade *et al.*, 1997; Mendes, *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2010).

Esses modelos de implantes têm sido utilizados por serem facilmente reproduzíveis e possibilitam objetividade na avaliação da angiogênese, inflamação e fibrose, bem como o monitoramento contínuo destes processos, além de permitir a investigação de várias características morfofuncionais tanto em condições normais como em patológicas.

1.4 – Angiogênese inflamatória induzida pelo *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado, digenético que pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Chagas 1909). Seu ciclo de vida alterna entre hospedeiros invertebrados e vertebrados.

A doença de Chagas se inicia com uma fase aguda, caracterizada pela presença de níveis elevados de parasitismo tecidual e sanguíneo, sendo o parasito facilmente detectado pelo exame de sangue a fresco. Esta fase essa, geralmente assintomática ou oligossintomática, o qual inclui sintomas não específicos, como: febre, calafrios, náusea, vômitos, diarréia e enfartamento ganglionar. Alguns sintomas são patognomônicos, como os sinais de porta de entrada do parasito (sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação), além de hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite (Laranja *et al.*, 1956). A maioria dos indivíduos sobrevive à fase aguda e evolui para a fase crônica da doença Chagas, caracterizada pelo baixo parasitismo sanguíneo e tecidual, além da presença de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*. É observada, nesta fase, uma grande variabilidade de manifestações clínicas que pode ser desde a ausência de sinais e sintomas, quando o paciente encontra-se na fase crônica indeterminada, até formas graves caracterizadas por manifestações cardíacas, digestivas ou mistas.

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve formas evolutivas diferentes que apresentam características morfológicas, bioquímicas e funcionais distintas (Brener, 1973; De Souza, 1984). As formas infectantes são as formas tripomastigotas, observadas em ambos os hospedeiros. Quando encontradas no hospedeiro vertebrado são denominadas tripomastigotas sanguíneas, e quando no hospedeiro invertebrado são chamadas tripomastigotas metacíclicas. As formas tripomastigotas sanguíneas podem ser encontradas nas formas: delgada, larga e muito larga (Brener, 1965).

As distintas formas do parasito possuem diferentes proteínas de membrana ou glicoproteínas em sua superfície, que apresentam papel essencial na internalização de células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos, essencial para desencadear uma resposta inflamatória. É sabido que proteínas de membrana do *T. cruzi* ativam receptores *Toll like* (TLR)-1, 2, 4, 5 e 6 ou TLRs 9 que por sua vez, desencadeará a ativação do fator nuclear kB (NF-kB) e mitógeno ativada da proteína quinase (MAPK), que acarretará a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Campos e Gazzinelli, 2004; Gazzinelli & Denkers, 2006; Bafica *et al.* 2006; Koga *et al.* 2006; McGettrinck & O'Neill, 2010). Ademais, outros receptores como receptor de manose e receptores citosólicos de domínio oligomerização ligados a nucleotídeos

(NOD)-like e a família de receptores como gene induzível ácido retinóico I, tem também sido recentemente mostrado a induzir a ativação de mediadores inflamatórios na presença do *T. cruzi*. (Silva *et al.*, 2010).

Entre essas proteínas de membrana, a glicosilfosfatidilinositol (GPI) apresenta habilidade de ativar a síntese de mediadores pró-inflamatórias por macrófagos (Campos *et al.*, 2001), como a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP)-1, mediador de recrutamento de leucócitos (Gazzinelli *et al.*, 1999). Outras duas glicoproteínas ligadas as GPI, mucina-GPI e transialidase participam ativamente na síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Coelho *et al.*, 2002). A transialidase apresenta capacidade estimulatória em monócitos e/ou macrófagos de camundongos (Gao & Pereira, 2001) e em humanos (Saavedra *et al.*, 1999) para produzir mediadores pró-inflamatórios. Da mesma forma, Tc52 é uma proteína do *T. cruzi* que também tem capacidade de estimular macrófagos (Fernandez-Gomez *et al.*, 1998). Ambos GPI-mucina e Tc52 podem sinalizar via receptor TLR2, em macrófagos e células dendríticas (Campos *et al.*, 2001; Ouaisi *et al.*, 2002).

Estudos com 10 isolados de tripomastigotas metacíclico do *T. cruzi* derivados de diferentes fontes em distintas regiões geográficas, revelaram grupos de parasitos que expressam distintas glicoproteínas de superfície e desempenham diferentes habilidades para invadir células de mamíferos *in vitro* (Yoshida, 2006). Entre uma diversidade de cepas e clones do parasito, CL classificada no grupo *T. cruzi* VI, CM17 *T. cruzi* III, Colombiana *T. cruzi* I, em especial a cepa Y do grupo *T. cruzi* II, abrange o ciclo doméstico/humano (Zingales, 2009) é sempre muito estudada em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Em particular, a cepa Y do *T. cruzi* é considerada parcialmente sensível à quimioterapia com Benzonidazol. Essa cepa foi isolada de um paciente na fase aguda da infecção por Pereira de Freitas em 1950, Marília, São Paulo (Freitas *et al.*, 1953) e, posteriormente estudada e descrita por Silva & Nussenzweig (1953). Trabalho realizado por Caldas *et al.* 2008 demonstraram que cães infectados com a cepa Y e outros grupos infectados com outras cepas (AAS, Be-78, VL-10) e tratados com Benzonidazol, revelou que o animais infectados com a cepa Y apresentou um número significativamente menor de células inflamatórias no miocárdio do átrio direito quando

comparados ao grupo controle em relação as demais cepas analisadas. Melo *et al.* 2011 demonstraram que cães infectados com a cepa Y e não tratados, apresentaram uma maior inflamação e remodelamento cardíaco quando comparado ao grupo tratado com Sinvastatina.

O processo de angiogênese na infecção pelo *Trypasoma cruzi* é considerado uma nova e promissora área de investigação. Poucas informações existem e as poucas existentes enfocam o papel da calreticulina do parasito exercendo atividade anti-angiogênica no hospedeiro vertebrado (Ferreira *et al.* 2004, 2005) e, dessa forma, induzindo proteção contra danos de natureza neoplásica. Entretanto, durante a cardiopatia chagásica há uma persistente ação inflamatória sobre esse órgão que, em poucos anos, findará com uma significativa perda funcional. A angiogênese cardíaca representa uma possível mudança nos paradigmas da abordagem terapêutica da doença de Chagas cardíaca, focando a possibilidade de substituição ou regeneração de grandes áreas ou estruturas cardíacas destruídas.

Mediante a interação existente entre parasito e hospedeiro, a resposta inflamatória direcionada ao sítio inflamatório cardíaco ocorrerá de forma moderada ou muito grave, ocasionando em alguns casos falência funcional do órgão ou mesmo morte do hospedeiro (Talvani & Teixeira 2011). As quimiocinas, por exemplo, apresentam um papel importante nesse processo inflamatório sítio-dependente por exercer função de recrutamento leucocitário. Recentemente, foi demonstrado que o *T. cruzi* é capaz de induzir a produção de quimiocinas em macrófagos via receptores *Toll* (TLR-2), tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Coelho *et al.* 2002, Carrera-Silva *et al.* 2008). E de acordo com o perfil de quimiocinas produzidas durante a infecção haverá a formação de um infiltrado inflamatório no miocárdio com fenótipos celulares específicos (macrófagos, células T CD8+), controlando dessa forma a replicação parasitária, mas lesando também o tecido do miocárdio. Além disso, alguns trabalhos recentes têm mostrado que diferentes TLRs são capazes de induzir a expressão e a secreção de fatores angiogênicos de diferentes tipos celulares (Grote *et al.* 2010, Grote *et al.* 2011).

A idéia da participação da angiogênese durante o desenvolvimento fisiopatológico da doença de Chagas cardíaca é cientificamente aceita. Porém, pouco se

conhece sobre o papel dos diferentes estímulos (pró - e antiinflamatórios) no modelo experimental da cardiopatia induzida pelo *T. cruzi*.

1.5 - Mediadores angiogênicos e inflamatórios

A angiogênese durante o reparo tecidual auxilia na restauração da perfusão vascular do tecido lesado e facilita o acesso de leucócitos para o local inflamado, que por sua vez, produzem uma grande quantidade de moléculas reguladoras da angiogênese, como Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Fator de crescimento transformante (TGF)-beta e Fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, proteinases, como as metaloproteinases e quimiocinas (Naldini & Carraro, 2005).

Neutrófilos iniciam o reparo de feridas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-alfa, Interleucina (IL)-1-alfa e IL-1-beta. Tais citocinas promovem a adesão leucocitária ao endotélio vascular e o reparo é iniciado. Como uma consequência do tecido lesado, os monócitos migram para o sistema venoso no sítio da injúria do tecido, sendo guiado por alguns fatores quimiotáticos, incluindo quimiocinas (CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES) e citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-1beta) (Kovacs, 1991). Uma vez presente no sítio da injúria, os monócitos se diferenciam em macrófagos maduros ou células dendríticas imaturas. Após a ativação, os macrófagos liberam fatores de crescimento e citocinas, como por exemplo, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF, fator de crescimento fibroblástico (FGF)-2, TGF-beta1, bem como TNF-alfa e IL-1 (Kovacs, 1991). Enquanto os macrófagos produzem esses efeitos no microambiente do dano, as células endoteliais, epiteliais e mesenquimais estão presentes regulando o remodelamento do tecido local pela modulação dos componentes da matriz extracelular e da angiogênese. Fibroblastos migram para o sítio da ferida e secreta colágeno do tipo III, sendo estimulado pelos fatores incluindo PDGF, TGF-beta1, IL-1-alfa e IL-1beta (Naldini & Carraro, 2005).

Dentre esses fatores, há um grande número de moléculas conhecidos que podem atuar como reguladores positivos de angiogênese, como fatores de crescimento fibroblasto ácido e básico (FGF-alfa e FGF-beta, respectivamente), fatores de

crescimento transformante ácido e básico (TGF-alfa e TGF-beta, respectivamente), fator de crescimento de hepatócito (HGF), TNF-alfa, PDGF, angiopoietinas, dentre muitos outros (Karamysheva, 2008).

Uma variedade de estudos sustenta à hipótese que outras citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-alfa, e células inflamatórias podem modular a angiogênese pelos efeitos diretos e indiretos nas células endoteliais, resultando na promoção do processo angiogênico (Naldini & Carraro, 2005; Barcelos, 2005).

1.5.1 – Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O Fator de crescimento vascular (VEGF) e seus receptores (VEGFR) consistem em uma família que representa os reguladores chave no processo angiogênico. O VEGF é conhecido como um fator de regulação da permeabilidade vascular. A capacidade deste fator em aumentar a permeabilidade vascular define o seu papel importante na inflamação e outros processos patológicos (Karamysheva, 2008).

O VEGF atua pela interação com seus receptores tirosina quinase VEGF-1 e VEGF-2 nas células endoteliais. Embora o VEGF se ligue aos dois receptores, parece que muitas de suas funções são mediadas pelo VEGF-2, assim induzindo migração, sobrevivência e proliferação das células endoteliais pré-existentes e a formação de uma nova vasculatura (Wheeler-Jones *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 1998).

O VEGF-A é um membro da família das proteínas que incluem VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de derivado de plaquetas (PDGF). Membros da família do VEGF se ligam através do sinal de três receptores tirosina quinase, VEGFR-1 (FLt-1), VEGF-2 (KDR) e VEGF-3. O VEGF-C e VEGF-D estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção de vasos linfáticos (Chung e Ferrara, 2010).

O VEGF aumenta a permeabilidade vascular através da formação de organelas vesículo-vacuolares nas células endoteliais, o que permite o extravasamento de proteínas proteolíticas plasmáticas para o meio extravascular. Tais enzimas proteolíticas são responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular permitindo a penetração endotelial no espaço perivascular (Distler *et al.*, 2003).

Como comentado anteriormente, o crescimento de novos vasos sanguíneos é fundamental para a inflamação e se associa a alterações estruturais, incluindo a ativação e proliferação das células endoteliais e o remodelamento dos capilares e vênulas, o que resulta em expansão da rede da microvasculatura do tecido (Majno, 1998; Bagli *et al.*, 2004). Uma consequência funcional dessa expansão é a promoção da inflamação através de vários mecanismos correlacionados. Primeiro, o influxo de células inflamatórias aumentará, em seguida, ocorrerá um aumento do suprimento de nutrientes que irá alimentar o processo imune metabolicamente ativo, e por último o endotélio ativado contribui para a produção local de citocinas, quimiocinas e metaloproteases (Szekanec & Koch, 2004; Chung e Ferrara, 2010). Por isso a expansão anatômica da rede microvascular combinada com essa ativação funcional pode continuar recrutando células inflamatórias. A angiogênese e a inflamação devem se tornar processos cronicamente co-dependentes (Bagli *et al.*, 2004; Szekanec & Koch, 2004; Campos *et al.*, 2006).

Nesse sentido, a compreensão do processo denominado angiogênese torna-se fundamental para se ter uma idéia da real interferência do *T. cruzi* sobre o processo angiogênico dependente da inflamação.

Estes e outros modelos de angiogênese são importantes para o estudo de eventos desencadeadores do processo angiogênico, como a inflamação. Ainda não está disponível na literatura nenhum estudo que tenha avaliado o processo de angiogênese inflamatória estimulado pela cepa Y do *T. cruzi*, com esse modelo teremos condições de analisar parâmetros angiogênicos induzido por antígenos bruto da forma tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos de antígenos brutos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* na angiogênese inflamatória induzida por implantes de esponja alojados no espaço subcutâneo em camundongos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar extratos antigênicos brutos da forma tripomastigota sanguíneo da cepa Y do *T. cruzi*;
- Avaliar através de parâmetros bioquímicos a cinética da angiogênese em implantes de esponjas carreando ou não antígenos brutos do *T. cruzi*.
- Avaliar a produção de mediadores inflamatórios (CCL2, CCL5, VEGF e TNF-alfa) nos implantes das esponjas;
- Avaliar a influência destes antígenos sobre o acúmulo de macrófagos, neutrófilos e sobre a deposição de colágeno.
- Avaliar parâmetros histomorfométricos na matriz das esponjas.

3 - Animais, materiais e métodos

3.1 – Animais

Foram utilizados para este estudo 70 camundongos Swiss machos de 18 a 20 gramas, provenientes do Centro de ciências animal do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto.

Os animais foram separados aleatoriamente (n=10) e distribuídos em grupos. A eutanásia foi realizada por overdose de anestesia (24mg/kg e 240mg/kg, respectivamente) de Xilazina/Cetamina respectivamente, de acordo com as normas éticas do Colégio Brasileiro de experimentação animal.

3.2 - Protocolo experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos: (i) animais que receberam uma dose única de 100µl de antígeno (10^8 formas tripomastigotas sanguíneas) no primeiro dia pós-implante (n=10); (ii) animais que receberam veículo 100µl PBS estéril (n=10); (iii) animais que não receberam nenhum tratamento, sendo as esponjas retiradas 24 horas após o implante (n=10). Para os animais dos grupos (i) e (ii) as esponjas foram retiradas para análise nos dias 4, 7 e 14 pós-implante.

3.3 - Antígenos do *Trypanosoma cruzi*

Foi utilizada a cepa Y do *T. cruzi* para avaliação de seus efeitos pró-angiogênicos e pró-inflamatórios no modelo de implante de esponja no espaço subcutâneo.

Foi mantida a cultura de células Vero (células de rim de embrião de macaco) em meio MEM (*minimum essential medium*), suplementado com soro fetal bovino 5% em estufa a 33°C e em seguida foi realizada a infecção dessas células com sangue contendo 10.000.000 de tripomastigotas, mantidos por 24 horas em estufa a 37°C. Após três dias os tripomastigotas foram coletados da cultura, centrifugados a 600 rpm, 26°C por 3 minutos para decantar as células Vero. Em seguida foi coletado o sobrenadante

contendo as formas tripomastigotas e centrifugado a 3.000 rpm, 4 °C por 10 minutos para decantar os parasitos sendo posteriormente, realizadas três lavagens sequenciais com PBS (Solução salina tamponada com fosfato) estéril a 3.000 rpm, 4 °C por 10 minutos. Depois essas formas tripomastigotas foram contadas e suspensas em PBS estéril para armazenamento em freezer - 20°C até o momento do uso.

3. 4 – Técnica de implantação da esponja

Discos de esponjas (poliéster poliuretano) de 8mm de diâmetro e 5mm de espessura foram mantidos em álcool 70% v/v durante, pelo menos 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervido em água destilada por 15 minutos. Estes implantes foram utilizados para induzir a inflamação, angiogênese e aderência subcutânea. (Andrade *et al.*, 1987; Barcelos, et al. 2004; Mendes *et al.*, 2007;).

Implantação subcutânea: Os animais foram previamente anestesiados intraperitonealmente, com Xilazina/Cetamina (8mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente), e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Os animais foram dispostos em mesa cirúrgica para a realização de uma incisão mediana dorsal de aproximadamente 1 cm em direção caudal. Posteriormente, foi realizada a divulsão do tecido subcutâneo interescapular pela incisão mediana. O disco de esponja foi introduzido e posicionado aproximadamente 0,5 cm da região interescapular. A sutura da incisão foi feita com fio de nylon 3,0 usando ponto Donati, após a cirurgia foi administrado uma dose de 20µl de antibiótico (Flotril 25mg/ml). (Andrade *et al.*, 1987). Os animais foram mantidos sob observação em ambiente com controle de temperatura após a cirurgia. Após recuperação da anestesia os animais ficaram dispostos em gaiolas com água e ração e mantidos em estantes aquecidas em torno de 24°C.

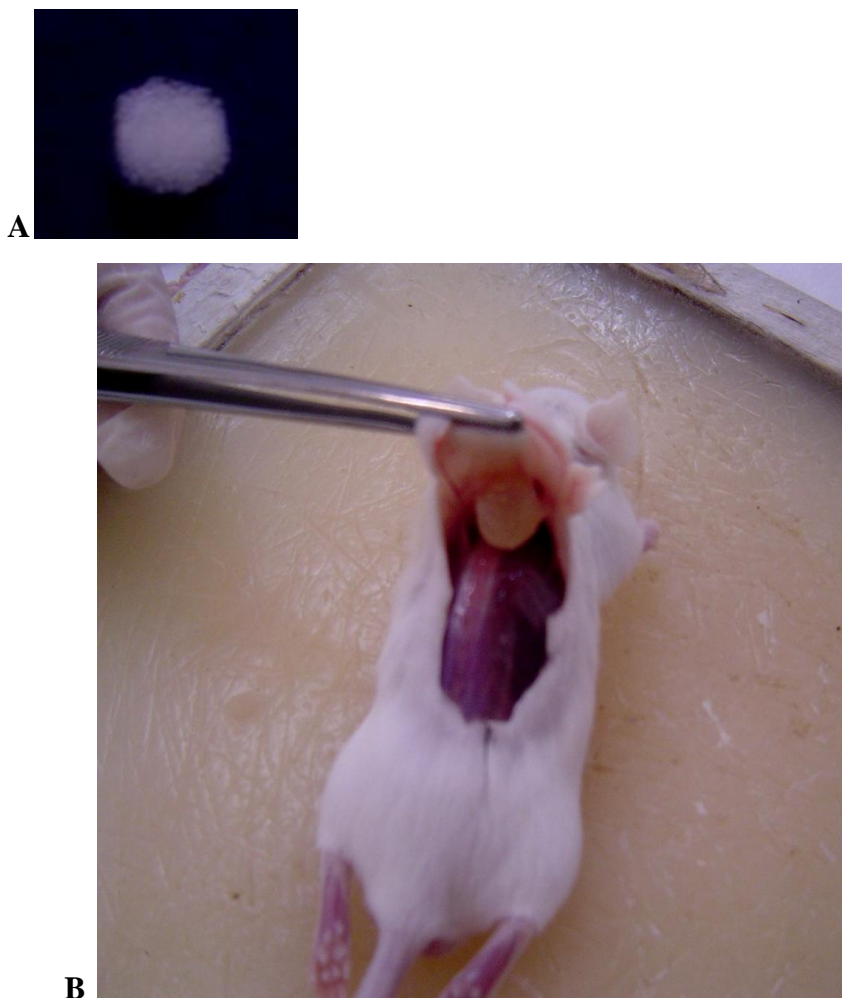


Figura 2. Esponja de poliéster poliuretano antes e após ser implantada e seu posicionamento na região subcutânea dorsal dos animais. Disco de esponja antes da implantação (A). Disco de esponja com 4 dias pós-implante (B).

3.5 - Remoção dos implantes

Nos dias 1º, 4º, 7º e 14º pós-implantação os animais foram anestesiados com Xilazina/Cetamina (8mg/kg e 60mg/kg, respectivamente). Após eutanásia, os discos de esponja foram retirados através de incisão mediana na região dorsal e em seguida dissecados (retirado ao máximo todo tecido conjuntivo aderido à esponja) e pesados e processados para estudos bioquímicos e histológicos.

3.6 - Avaliação histológica dos implantes de esponja

Foram reservados implantes para a avaliação histológica, realizada nos tempos de 1, 4, 7, 14 dias pós-implante. Os tecidos coletados para avaliação histológica foram fixados em solução formol-salina a 10% durante 24 horas sendo em seguida, realizado o processamento histológico que inclui desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Após estes procedimentos os blocos foram cortados a 5 μ m e corados com hematoxilina-eosina (HE). Os cortes histológicos dos implantes foram examinados ao microscópio óptico, usando-se ocular de 10x e objetivas 10x, 20x e 40x e fotografados para posterior análise qualitativa e quantitativa.

O índice de vascularização presente nos implantes foi avaliado por meio de análises morfométricas pelo *software* Leica. Para a contagem dos vasos sanguíneos, esses foram definidos como estruturas com luz de células endoteliais e presença ou não de hemácias. O número mínimo de campos contados para a determinação do número de vasos foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra. Em uma lâmina representativa de cada grupo experimental foi determinado o número de vasos em 50 campos (aumento de 40x). Com os dados dessas 50 amostras foram criados, através de sorteio com reposição, grupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 amostras. A média e o desvio padrão foram calculados para cada grupo. O número mínimo representativo de campos microscópicos por tratamento foi obtido quando o aumento no número de campos não resultou em considerável redução ($\leq 5\%$) no respectivo valor do desvio padrão. Os resultados foram expressos em média \pm SEM do número total de vasos/15 campo.

3.7 – Avaliação da angiogênese e da infiltração tecidual

3.7.1 - Dosagem de hemoglobina

A dosagem do conteúdo de hemoglobina intrainplante foi feita utilizando-se o método do reagente de Drabkin desenvolvido em 1932 e adaptado como índice de vascularização por Plunkett *et al.* (1990) e Hu *et al.* (1995).

As amostras que apresentaram hemorragia à análise macroscópica foram excluídas do ensaio. Em seguida, cada implante foi pesado e homogeneizado em 0,2 ml do reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina - Labtest) e adicionados em microtubos da marca *Ependorff* de 2,0 ml. As amostras foram centrifugadas a 1.200 rpm (4°C por 30 minutos) e o sobrenadante filtrado à 0,22µm (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica desse sobrenadante em comprimento de onda de 540 nm (Leitor de ELISA), utilizando-se uma placa de 96 poços de fundo chato. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest, Belo Horizonte/MG) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido de implante.

Após a dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi armazenado em freezer - 20°C para posterior dosagem de mediadores inflamatórios e angiogênicos e o precipitado (esponja) dividido e pesado para determinação de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-d-glicosaminidase (NAG).

3.7.2 - Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A presença de neutrófilos no sítio inflamatório é uma das características marcantes do processo inflamatório, sendo que o acúmulo dessas células pode ser detectado utilizando a enzima mieloperoxidase (MPO) como um marcador quantitativo, por estarem presentes nos grânulos azurófilos dessas células. A dosagem de MPO é uma técnica que tem sido usada com sucesso como um marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos na lesão e permite demonstrar componente inflamatório de forma quantitativa (Mullane *et al.*, 1985; Cross *et al.*, 2003). Para avaliar a atividade da

MPO utilizamos a técnica de Bradley *et.al*, 1982; adaptado para a esponjas por Barcelos *et al* 2004.

O precipitado da esponja foi ressuspenso em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio à 80 mM, Ph 6,0. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 30 segundos, transferidos 300 µL da amostra para um microtubo e foram acrescidos 600 µL de HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio-Sigma) a 0,75%, em tampão fosfato de sódio a 80 Mm, pH 5,4, misturados, sonicada durante 10 segundos e centrifugados a 2.700g por 10 minutos a 4°C.

Em seguida, esse sobrenadante foi usado em um ensaio enzimático. Em um microtubo foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1,2mM em tampão fosfato de sódio 80 mM diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) - Merck e 200 µL do sobrenadante das amostras. Esses reagentes foram incubados a temperatura ambiente durante 1 minuto. Após este período, foi adicionado H₂SO₄ (ácido sulfúrico) a 4M para paralisar a reação. Transferiu-se 200 µL do produto da reação para a placa de ELISA e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 450 nm. A atividade de MPO foi expressa em densidade óptica (OD) / mg de tecido.

3.7.3 – Dosagem da atividade da N-acetil--β-d-glicosaminidase (NAG)

De forma similar aos neutrófilos, os macrófagos também exercem papel importante no sítio inflamatório e, após sua ativação produzem a enzima lisossômica N-acetil-β-d-glicosaminidase (NAG). A dosagem do NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (Bailey, 1988; adaptado para a esponjas por Barcelos *et al* 2004). Da mesma forma descrita no item (3.6.2), o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2,0 mL de solução de NaCl a 0,9% w/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100. Procedeu-se à centrifugação a 3000g durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi separado para o ensaio enzimático. No ensaio foram adicionados 100 µL do sobrenadante das amostras a placa de ELISA. Às amostras foram adicionadas 100 µL do substrato NAG (Sigma) a 2,24 mM diluído em tampão citrato-fosfato pH 4.5 (200 mL de ácido cítrico a 0,1M; 310 mL de Na₂HPO₄ a 0,1M). Sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 60 minutos. Para paralisar a

reação foram adicionados 100 µL de tampão glicina pH 10.6 (misturados volumes iguais de glicina a 0,8M; NaCl a 0,8M e NaOH a 0,8M) em cada poço. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA a 400nm. Os resultados foram expressos como atividade NAG em densidade óptica (OD)/mg tecido.

3.7.4 – Avaliação da deposição de colágeno

A fibrose foi avaliada pela dosagem de colágeno presente nos implantes. A quantidade de colágeno solúvel total (tipos I-V) foi quantificada colorimetricamente baseada na reação do *picrossirius red*. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada para o modelo de implantes de esponja por Campos e colaboradores (2006) como um método de ligação ao (GLY-X-Y)_n das sequências de tripla hélice de todos os colágenos nativos.

As amostras de esponja foram homogeneizadas com tampão (salina 0.1% Triton X-100) depois da homogeneização os *debris* foram removidos pela centrifugação. Foi adicionado 50µl do reagente *picrossirius red* a 50µl da amostra. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrossirius red foi separado por centrifugação a 10. 000 durante 15 minutos, em seguida lavado com etanol e o complexo colágeno-corante reconstituído em 1 ml de reagente alcalino (NaOH 0,5M). A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas (Thermoplate). A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada pela comparação de uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados expressos em microgramas de colágeno por mg de implante.

3.7.5 – Avaliação de mediadores inflamatórios e angiogênicos

Após a dosagem de hemoglobina, utilizou-se o sobrenadante para a avaliação dos mediadores inflamatórios e angiogênicos. Foram adicionados 100 µL do sobrenadante em 500 µL de PBS pH 7,4 contendo 0,0 5% de Tween-20 e centrifugado a 12. 000g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi usado para utilização em imunoensaio. As concentrações de CCL2, CCL5, VEGF e TNF-alfa foram determinadas no sobrenadante utilizando-se kits da Peprotech (Ribeirão Preto/SP), específico para cada citocina e de

acordo com o protocolo do fabricante. O ensaio foi realizado usando placa de microtitulação (ELISA) sensibilizada com anticorpo primário específico para a citocina a ser avaliada e incubada a 4°C durante 12 horas. Após lavagem foi adicionado tampão de bloqueio para bloquear os sítios de ligação inespecíficos. Os padrões e amostras foram adicionados a placa após lavagem e incubados a 4°C durante a noite. Nova lavagem foi seguida da adição de anticorpo de detecção apropriado e incubação durante 2 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem e adição do conjugado estreptavidina-peroxidase e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada, foi adicionado OPD (1,2-Diaminobenzidina) diluído em tampão citrato a 0,03M pH 5,0 contendo 0,02% de H₂O₂ 30 v/v. A placa foi incubada abrigada da luz durante 30 min. A reação foi paralisada por adição de H₂SO₄ a 1M. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 492 nm. Os resultados foram expressos em pg (picogramas)/mg de tecido.

3.7.6 – Análise estatística

Para estabelecer o número de animais por grupo de tratamento foram conduzidas análises estatísticas para determinação do tamanho da amostra, a um nível de significância de $p < 0,05$.

A análise do intervalo de confiança da média nos experimentos pilotos (para as dosagens bioquímicas e análises morfométricas) mostrou que as variáveis estudadas apresentaram baixos valores de erro padrão e que com $n=10$ animais e $n=15$ campos houve confiabilidade nos resultados. Os resultados foram apresentados pelas médias \pm erro médio padrão (SEM). A comparação entre os dois grupos foi feita utilizando-se o teste *One Way ANOVA*. Para realização da análise e construção de gráficos foi utilizado o programa *GraphPad Prism 4.0*.

4 – Resultados

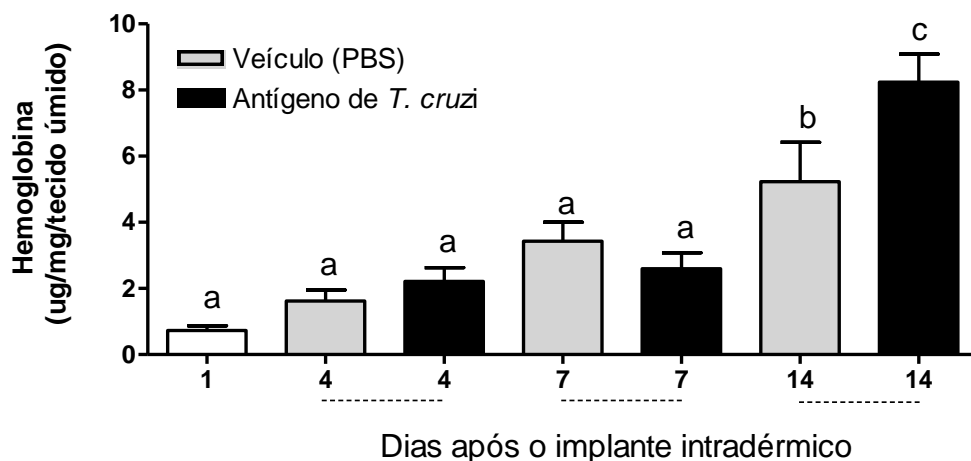
4. 1 - Efeitos da aplicação de antígenos brutos de formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* nos implantes das esponjas na avaliação da inflamação, angiogênese e deposição de colágeno.

O procedimento cirúrgico, a matriz de esponja e a aplicação de antígeno bruto do *T. cruzi* diretamente no implante da esponja foram bem toleradas por todos os animais, não apresentando alterações visíveis no comportamento e no local da cirurgia.

4.1.1 – Avaliação da angiogênese

A dose única de 100µL de antígeno da cepa Y (10^8 formas tripomastigotas sanguíneas) aplicados diretamente nas esponjas alojadas no espaço subcutâneo de camundongos induziu o recrutamento de células inflamatórias e seus produtos solúveis que possibilitaram o aumento da neovascularização dos implantes como observado nas alterações do conteúdo de hemoglobina (Figura 3A) e níveis de VEGF nos implantes (um marcador de angiogênese) (Figura 3B), quando comparados ao grupo controle.

A



B

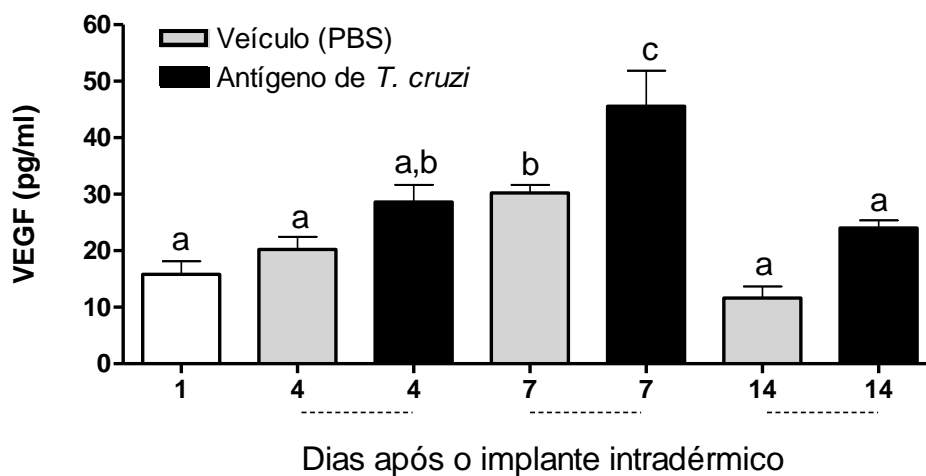


Figura 3: Análise bioquímica da hemoglobina (A) e da produção de VEGF (B) no homogenato das esponjas sob estímulo ou não com antígenos do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) avaliadas em etapas distintas após o implante. O dia 1 representa 24h após o implante sem administração do antígeno na matriz da esponja. Os resultados são apresentados como média \pm SEM e letras diferentes entre as barras significam diferença estatística ($p < 0.05$).

4.1.2 - Avaliação da inflamação

A quantidade de neutrófilos recrutada (avaliado como atividade da enzima MPO) (Figura 4A) não foi afetada pela presença dos antígenos do *T. cruzi* (cepa Y) em nenhum dos tempos avaliados, mostrando-se similar ao perfil do grupo que recebeu apenas PBS (veículo). No entanto, como já conhecido e pré-estabelecido para este modelo de implante de esponja, foi observada uma maior quantidade de neutrófilos nos primeiros dias pós-implante (dias 1 e 4) por se tratar de um evento inflamatório agudo.

Por outro lado, ao avaliar a quantidade de macrófagos presentes na esponja pela medida indireta da enzima NAG, observou-se um aumento no recrutamento dessas

células associado à presença de antígenos do *T. cruzi* (cepa Y) ocorrido entre o 4º e o 7º dia pós-implante, mas evidenciado principalmente no 7º dia (Figura 4B).

A

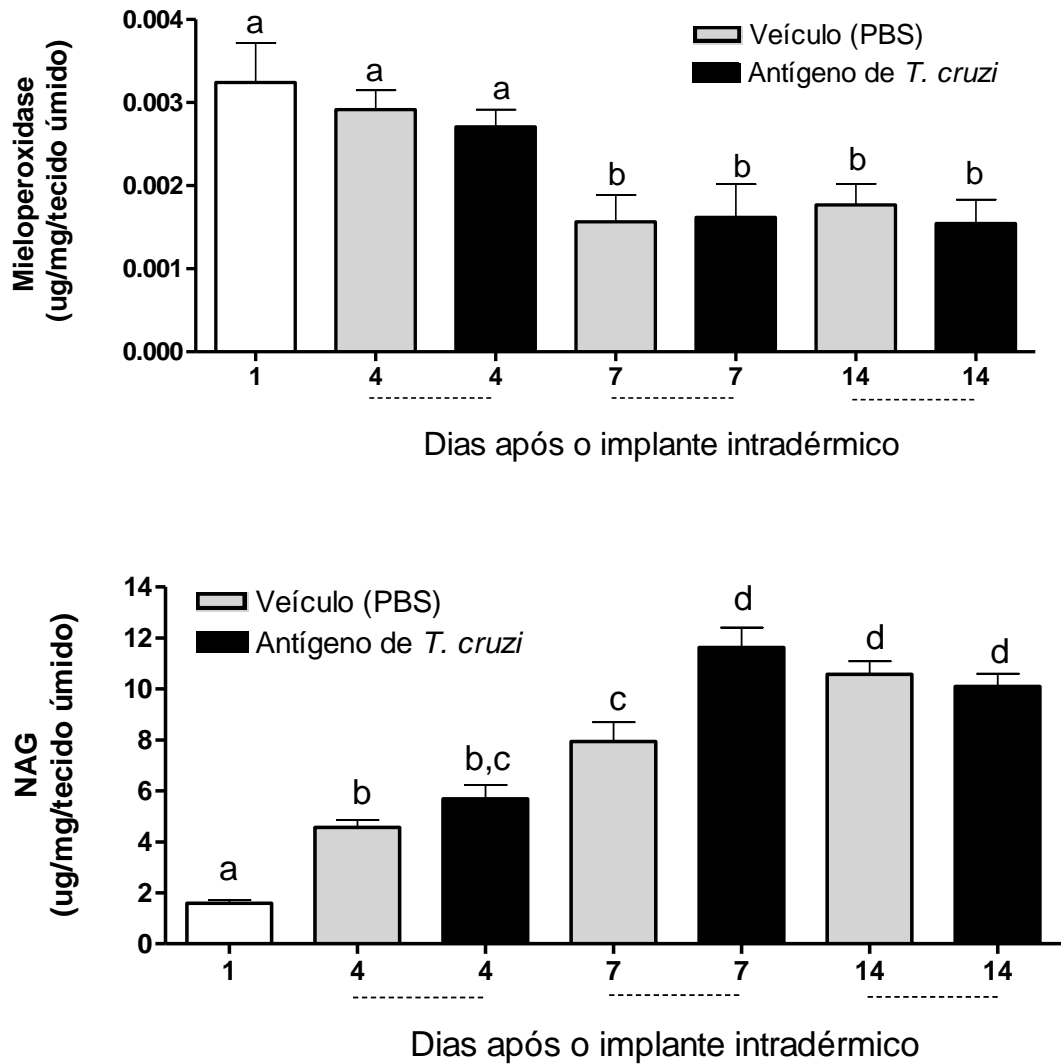


Figura 4. Análise bioquímica da mieloperoxidase (MPO) (A) e N-acetilglucosaminidase (NAG) (B) nas esponjas estimuladas com antígenos do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) ou não e avaliadas em etapas distintas após o implante. O dia 1 representa 24h após o implante sem administração do antígeno na matriz da esponja. Os resultados são apresentados como média +/- SEM e letras diferentes entre as barras significam diferença estatística (p<0.05).

4.1.3 - Formação da matriz extracelular e deposição de colágeno

A cinética da deposição de colágeno nos implantes de esponja nos grupos controle e tratado foi determinado por análise densitométrica usando coloração com *picrosirius red*. Não houve, entretanto, diferença evidenciada entre as esponjas que receberam os antígenos do *T. cruzi* daquelas que receberam o veículo de administração deste antígeno. Finalmente, a detecção bioquímica de colágeno foi evidenciada nestas esponjas nos primeiros momentos à partir da presença de neutrófilos (1º dia) no ápice da inflamação conduzida por macrófagos (7º dia) e permaneceu elevada até o 14º dia pós-implante, entretanto não apresentando diferença entre os grupos (Figura 5).

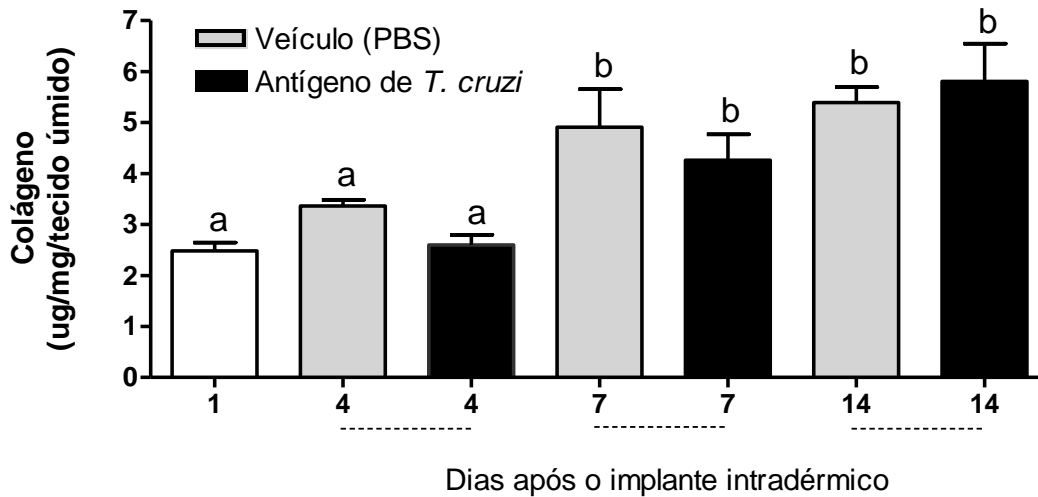
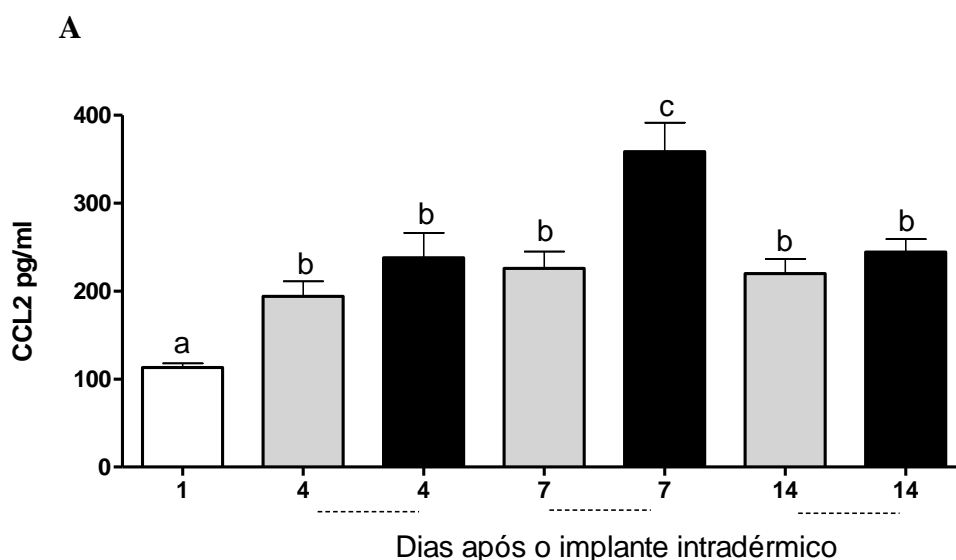


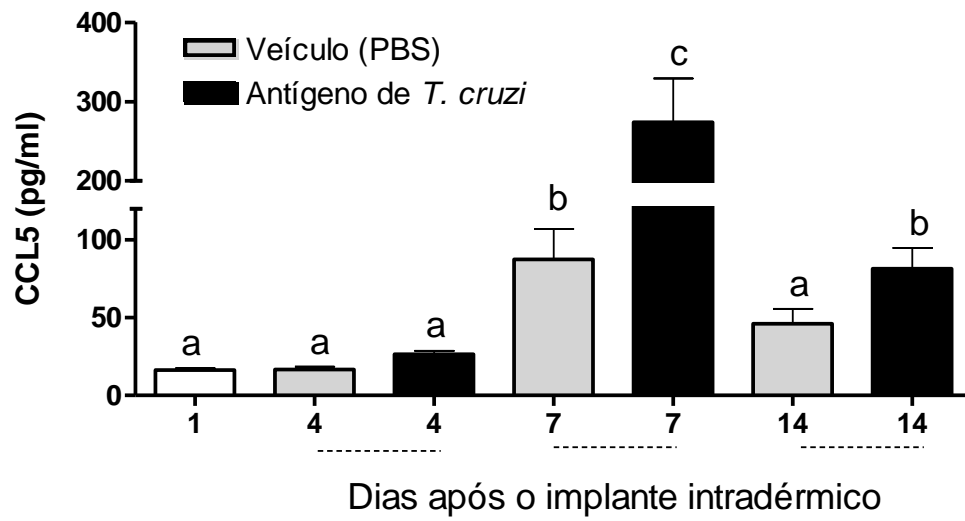
Figura 5. Análise densimétrica da deposição de colágeno total nos implantes de esponja estimuladas com antígenos do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) ou não e avaliadas em etapas distintas após o implante. O dia 1 representa 24h após o implante sem administração do antígeno na matriz da esponja. Os resultados são apresentados como média +/- SEM e letras diferentes entre as barras significam diferença estatística ($p < 0,05$).

4. 2 – Avaliação dos mediadores inflamatórios CCL2, CCL5 E TNF-alfa nos implantes

A CCL2 também conhecida como MCP-1(*monocyte chemotactic protein-1*) é uma quimiocina que participa ativamente no recrutamento de monócitos para o sítio da inflamação apresentou níveis elevados no grupo estimulado pelo antígeno do *T. cruzi* no 7º dia quando comparado ao controle (Figura 6A). Os níveis de CCL5, quimiocina conhecida como RANTES (*Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*), atua juntamente com o CCL2 no recrutamento de monócitos e também células T, mostrou diferença entre os grupos no 7º dia pós-implante, apresentando um aumento no grupo estimulado quando comparado ao controle (Figura 6B). Da mesma forma, os níveis de TNF-alfa nos implantes foram elevados no 7º dia no grupo estimulado quando comparado ao controle (Figura 6C).



B



C

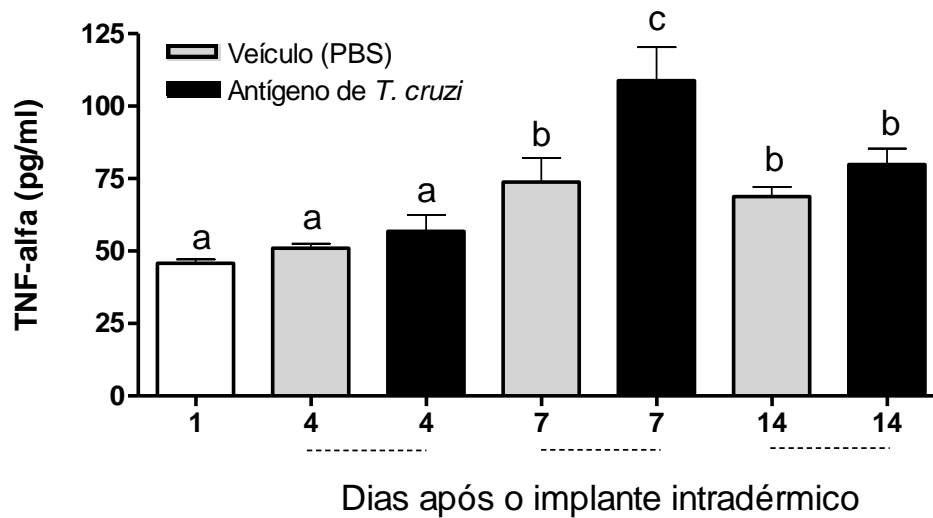


Figura 6. Produção de mediadores inflamatórios CCL2/MCP-1 (A), CCL5/RANTES (B) e TNF-alfa (C), o homogenato das esponjas sob estímulo ou não com antígenos do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) em diferentes dias após o implante. O dia 1 representa 24h após o implante sem inserção do antígeno na matriz da esponja. Os resultados são apresentados como média \pm SEM e letras diferentes entre as barras significam diferença estatística ($p < 0.05$).

4.3 – Avaliação histológica

Todos os animais toleraram bem a matriz esponjosa. Não foi observado nenhum sinal de infecção ou rejeição do implante no compartimento da esponja durante os 14 dias do experimento. A administração de 100µL antígeno bruto (10^8 formas tripomastigotas sanguíneas), durante todo período experimental (4, 7 e 14 dias) não mostrou sinais de toxicidade ou alterações na atividade motora dos animais. Não se observou nenhum sinal de infecção ou rejeição do implante no compartimento da esponja durante os 14 dias do experimento.

Os implantes de ambos os grupos, após coloração com (HE) mostraram crescimento de um estroma fibrovascular nos três intervalos de tempo estudados (4, 7 e 14 dias após o implante de esponja). As alterações histológicas durante o desenvolvimento do tecido fibrovascular são ilustradas na (Figura 7). No 4º dia, os implantes do grupo estimulado com antígeno da cepa Y do *T. cruzi* mostraram acúmulo de células inflamatórias, significativamente maior em comparação ao grupo controle não infectado. Observando do 7º ao 14º dia, as esponjas apresentavam-se mais vascularizadas e continham muito mais células inflamatórias e fibroblastos no tecido de granulação quando comparadas as esponjas do grupo controle não estimulado.

A área ocupada pelo tecido fibrovascular e a deposição de tecido conjuntivo foi progressivamente aumentada ao longo de todo período de implantação em ambos os grupos.

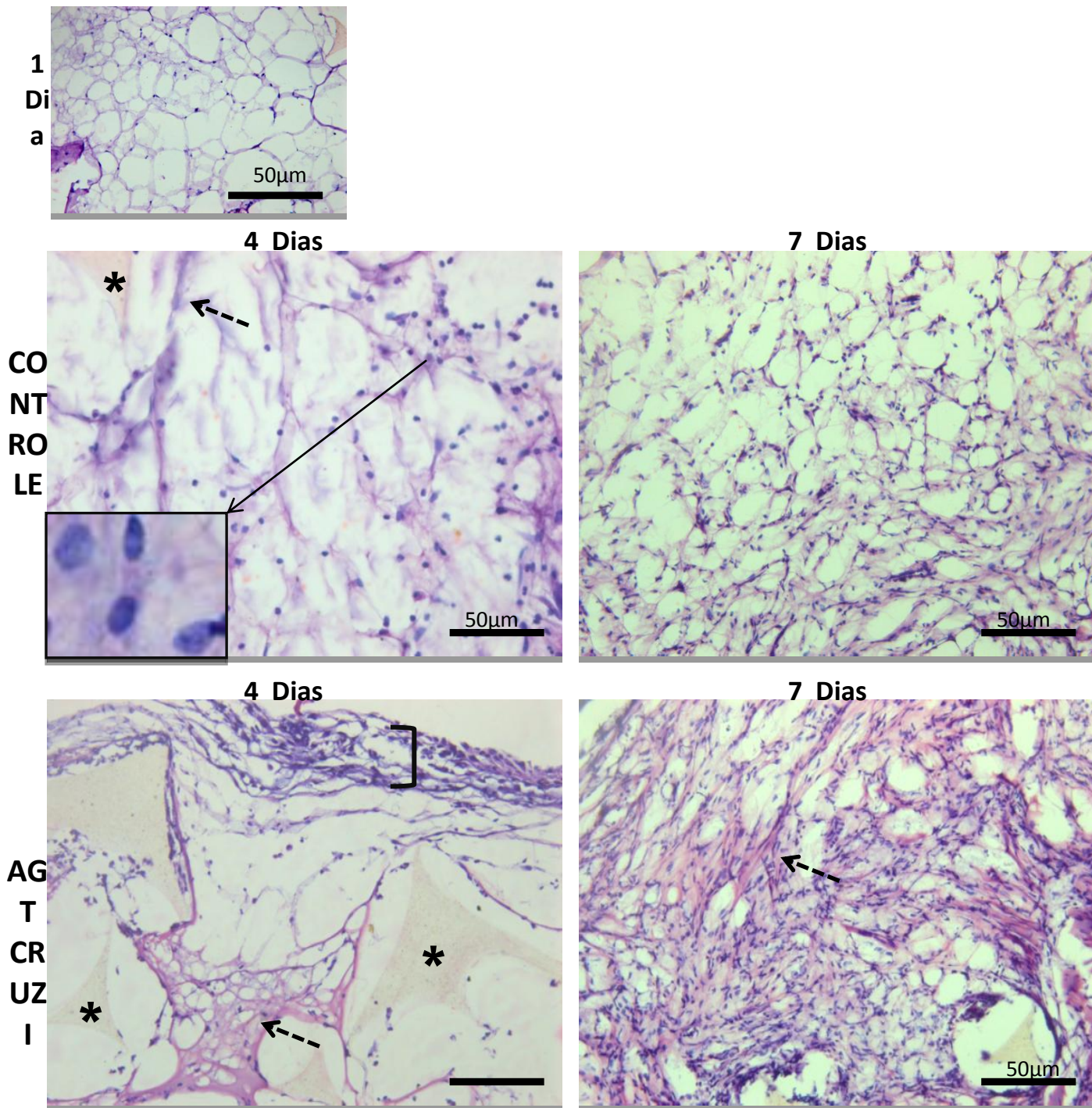


Figura 7. Fotomicroscopia de cortes histológicos representativos dos implantes de esponja dos grupos controle e infectado com antígenos da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* nos tempos de 1, 4, 7 e 14 dias. Os implantes de esponja (*) (corte de 5 µm e corados com HE) foram progressivamente preenchidos por células inflamatórias predominantemente do tipo mononuclear, brotos vasculares, fibroblastos e

fibras colágenas (tecido de granulação). A intensidade do infiltrado inflamatório, a formação do tecido de granulação e a angiogênese foram mais exacerbados nos implantes do grupo infectado quando comparado ao grupo controle não infectado em todos os tempos avaliados. Os destaques mostram células inflamatórias (macrófagos). Setas pontilhadas: tecido conjuntivo. V: vasos.] acúmulo de células inflamatórias. Barra = 50 μ m.

5 – Discussão

Em modelos experimentais utilizando camundongos infectados por diferentes cepas do *T. cruzi*, foi determinada a expressão e o papel de inúmeros mediadores inflamatórios potencialmente capazes de promover proteção contra o *T. cruzi*, mas também desencadear uma resposta inflamatória condutora do processo de remodelamento cardíaco nesses animais. Inicialmente, a resposta inflamatória à infecção pelo *T. cruzi* é coordenada por células do sistema mononuclear fagocitário (ex. macrófagos) que respondem aos antígenos do parasito através de uma via dependente de receptores do tipo *Toll* (TLR)-Myd88. Essa ativação origina mediadores pró-inflamatórios como IL-12, TNF-alfa dentre outros (Campos & Gazzinelli 2004).

A ligação de glicoproteínas do parasito às células fagocíticas liberam diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, como TNF-alfa e IL-12, quimiocinas e óxido nítrico (Camargo *et al.*, 1997; Coelho *et al.*, 2002; Talvani & Texeira 2011). Estas interações promovem a primeira linha de defesa, embora apresentando eficácia limitada, contra a infecção e o fornecimento de sinais inflamatórios necessários para uma resposta imune adaptativa. A produção de quimiocinas é essencial para o recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados/inflamados. Atraindo leucócitos, as quimiocinas são relevantes para mediar à proteção contra infecção, mas também contribuem para a inflamação do tecido e eventuais danos (Talvani & Teixeira, 2011). Este mecanismo inflamatório ou mesmo aquele persistente por meses ou anos de infecção parece contribuir para a produção de mediadores que atuem no processo angiogênico local, inibindo ou estimulando a formação de novos vasos.

Utilizando o modelo de implante de esponjas dorsais em modelo murino, nosso grupo demonstrou previamente que o processo inflamatório precede e acompanha a

angiogênese patológica, evidenciada tanto pelo aumento na permeabilidade vascular quanto pelo recrutamento de monócitos/macrófagos e neutrófilos para os sítios de angiogênese (Barcelos *et al.* 2004, 2005). Em teoria, durante o processo inflamatório, novos vasos formados supririam o tecido inflamatório com oxigênio e nutrientes e, em contrapartida, facilitariam também o transporte de células inflamatórias para o sítio inflamatório. Porém, nestes estudos prévios, o processo de angiogênese inflamatória foi estudado na ausência de microorganismos patogênicos (bactérias, protozoários etc).

Neste presente trabalho, a associação entre antígenos do *T. cruzi* e o processo angiogênico foi avaliada no modelo de implantação de esponjas sintética como etapa inicial de uma série de estudos envolvendo “inflamação induzida pelo parasito” e “a formação de novos vasos”. A matriz esponjosa mostrou-se bem tolerada por todos os animais não havendo indícios de rejeição ou infecção bacteriana. Após a administração dos antígenos do *T. cruzi* (cepa Y do parasito), não foi observada mortalidade entre os animais durante as duas semanas de experimentação.

O modelo de implante de esponjas sintéticas em camundongos é utilizado para avaliar componentes-chave (angiogênese, inflamação e fibrose) do tecido fibrovascular induzido pelos implantes. Alguns estudos utilizaram este modelo para avaliar esses parâmetros por uma série de compostos com potenciais terapêuticos (Belo *et al.*, 2004, Ferreira *et al.* 2007, Araújo *et al.* 2010)

O modelo de implante da matriz esponjosa desencadeia uma resposta inflamatória crônica conhecida como reação do tipo, corpo estranho, onde é formado um microambiente dinâmico e espacialmente bem organizado. Essa reação é regulada por mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas e metaloproteinases. Esses mediadores promovem ativação celular, angiogênese, extravasamento, migração, fagocitose e fibrose (Luttikhuisen *et al.* 2006).

Os componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzidos pelo implante de esponja foram avaliados através de ensaios que correlacionam à atividade enzimática com a quantidade de células inflamatórias, recrutadas na lesão durante a inflamação, como descrito previamente (Barcelos *et al.* 2004, 2005).

A avaliação de neutrófilos quantificados pela enzima MPO não apresentou diferença entre os grupos nos tempos avaliados. Entretanto, o ápice da presença de neutrófilos foi observado no 4º dia, apresentado um perfil já esperado por se tratar de

uma inflamação aguda. Entretanto, a quantidade de macrófagos presentes na matriz esponjosa medida indiretamente pela enzima NAG, aumentou no grupo estimulado pelos antígenos do *T. cruzi* (cepa Y) entre 4º e 7º dia pós-implante, apresentado diferença entre os grupos no 7º dia.

Nossos resultados confirmam um aumento de macrófagos associados à simples presença de implante no compartimento subcutâneo do animal (Barcelos *et al.* 2004). No entanto, em presença dos antígenos do *T. cruzi*, houve uma elevação significativa dos níveis enzimáticos observados, exceto na presença de neutrófilos. Esse achado confirma, inclusive, a importância desse fenótipo celular em atuar na fase inicial de invasão desse protozoário no modelo animal. Tem sido descrito que os macrófagos quando ativados na presença dos antígenos do *T. cruzi* produziu citocinas importantes para o controle do parasitário (Coelho *et al.* 2002). Sendo, portanto encontrado macrófagos no sítio inflamatório inicial (Talvani *et al.* 2000). Estas células apresentam papel crucial, tanto na eliminação dos parasitos quanto na produção aguda e crônica de citocinas e quimiocinas responsáveis pela exacerbação do processo inflamatório durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* (Talvani *et al.* 2000). Neste sentido, parte dos produtos solúveis produzidos por estas células no 7º dia parece contribuir para a formação conseguinte de vasos sanguíneos, havendo uma elevação na presença de hemoglobina (forma indireta de avaliar a presença de vasos) no 14º dia pós-implante. Houve, entretanto, diferença evidenciada entre as esponjas que receberam os antígenos do *T. cruzi* daquelas que receberam o veículo de administração deste antígeno. Finalmente, a detecção bioquímica de colágeno foi evidenciada nestas esponjas à partir do ápice da inflamação conduzida por macrófagos (7º dia) e permaneceu elevada até o 14º dia pós-implante, não apresentando diferença entre os grupos. Os experimentos que avaliaram os efeitos do estímulo de antígenos das formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* mostraram que a técnica de implantação induziu a formação de um estroma fibrovascular que diferiu do grupo controle quanto ao desenvolvimento seqüencial da inflamação, angiogênese e da produção de citocinas, não sendo observada diferença entre os grupos com relação à deposição da matriz extracelular. A deposição do colágeno após uma lesão é um marco do reparo tecidual. No entanto, os resultados obtidos mostram que, embora os antígenos tenham estimulado o aumento de importantes componentes do tecido fibrovascular (recrutamento celular e formação de

vaso) no 7º dia, a deposição de colágeno não foi alterada. Esse resultado pode ser explicado devido ao tempo analisado, provavelmente encontraríamos uma diferença entre os grupos com mais tempo de implante.

Havendo um aumento do processo inflamatório induzido pelos antígenos bruto do parasito no 7º dia pós-implante e uma predominância de macrófagos neste ambiente, observou-se também produção de mediadores inflamatórios solúveis associados a este grupo celular. Houve um aumento na produção de TNF-alfa no 7º dia pós-implante. Os macrófagos apresentam-se como principais produtores de TNF-alfa na infecção experimental pelo *T. cruzi* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hunter *et al.* 1996, Michailowsky *et al.* 2001). O TNF-alfa é uma relevante citocina pró-inflamatória/fibrolítica e fibrogênica, foi observado um pico desta citocina no grupo estimulado no 7º dia pós-implante quando comparado ao controle. Evidências *in vitro* (macrófagos) e *in vivo* indicam que a infecção com *T. cruzi*, ambos em humanos e modelo murino produzem altos níveis de TNF-alfa (Silva *et al.* 1995; Vekemans *et al.* 2000). Esta citocina apresenta papel autócrino, parácrino/endócrino e, pela sua ação direta sobre distintas células do sistema imune, acredita-se que sua elevada produção tenha contribuído diretamente para o aumento das quimiocinas CCL2 e CCL5, também importantes mediadores do recrutamento celular na doença de Chagas experimental (Marino *et al.* 2004, Talvani & Teixeira 2011).

As quimiocinas mostram efeitos pleiotrópicos em outras funções biológicas. Estes ligantes parecem ser importantes na regulação da angiogênese em condições inflamatórias e fibrose. Algumas quimiocinas, da família do CXC desenvolvem papel crítico na angiogênese fisiológica e patológica, incluindo no contexto inflamação crônica e fibrose. Enquanto a maioria dos estudos tem centrado esforços no entendimento sobre a regulação da angiogênese o papel da família CXC, vários membros da família de quimiocinas CC, incluindo CCL11, CCL16 e CCL21 têm sido implicados na angiogênese. Entretanto a CCL2 é a quimiocina mais estudada da família CC relacionada à angiogênese, células endoteliais expressam receptores para essa citocina, o CCR2, e demonstra quimiotaxia e formação de tubo celular em resposta a CCL2 *in vitro* (Salcedo *et al.*, 2000). *In vivo* a angiogênese mediada por CCL2 tem sido demonstrada em implantação de córnea, membrana corioalantóide de pinto, matrigel *plug* e modelos de implantação de esponjas (Goede *et al.*, 1999; Salcedo *et al.*, 2000;

Barcelos *et al.* 2004B) e parece ser independente de sua indução do recrutamento de leucócitos (Salcedo *et al.*, 2000, Mehrad *et al* 2007).

Macrófagos de humanos e murinos, bem como cardiomiócitos produzem quimiocinas como CCL2, CCL3 e CCL5 depois de ter sido infetado com o *T. cruzi in vitro*, e estas quimiocinas respondem aumentando a absorção do parasito, devido ao recrutamento de células fagocíticas mononuclear, aumentando a produção de óxido nítrico e controlando a replicação do parasito. Tem sido mostrado que diversos tipos celulares e moléculas solúveis participam no controle da infecção bem como na indução da patogênese durante a infecção pelo *T. cruzi* (Gutierrez *et al.* 2009).

Da mesma forma que os mediadores inflamatórios, observou-se uma elevada produção de VEGF, considerado um marcador molecular da angiogênese, no 7º dia pós-implante. Esta elevação foi característica das esponjas que receberam o antígeno bruto do *T. cruzi* (cepa Y), sugerindo a idéia que as “glicoproteínas” de superfície do parasito sejam capazes de induzir tanto citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias quanto fatores angiogênicos como o VEGF. Esta ativação exacerbada de fatores solúveis no 7º dia, principalmente do VEGF, parece ser a responsável pelo aumento de hemoglobina (neovasos) observados no 14º dia.

O VEGF é o mais potente fator pró-angiogênico descrito, em particular VEGF-A, capaz de induzir a proliferação, brotamento e a formação do tubo das células endoteliais. O processo angiogênico é organizado pela interação entre células endoteliais, células estromais e células murais, sendo a matriz extracelular formado por essas células (Chung & Ferrara, 2010). A angiogênese, formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, é um processo complexo que depende da interação de vários mediadores pró e anti-angiogênicos para a formação de vasos funcionais. O VEGF, apesar de ser apenas um componente da complexa resposta angiogênica, é considerado um dos fatores essenciais envolvido no processo angiogênico (Yancopoulos *et al.*, 2000).

Nosso estudo demonstrou um aumento em citocinas pró-inflamatórias, pró-angiogênicas e pró-fibrogênicas presentes no implante da esponja. A avaliação histológica dos implantes de esponja confirmou o aumento do infiltrado do tecido fibrovascular induzido pela matriz esponjosa no grupo estimulado pelos antígenos.

O estroma fibrovascular das esponjas, principalmente no 7º dia, é composto de vasos sanguíneos iniciais, macrófagos, neutrófilos, linfócitos (identificado apenas morfológicamente) e fibroblastos, em meio ao tecido conjuntivo frouxo da matriz extracelular. Este padrão inflamatório exacerbado pôde ser melhor observado nas esponjas estimuladas com antígenos do *T. cruzi* (cepa Y do parasito). Já o número de vasos no 14º dia elevou-se também nos discos de esponja que receberam o antígeno, havendo diferença estatística ao avaliar o conteúdo de hemoglobina no 14º dia pós-implante nesse material.

Por outro lado, os implantes de ambos os grupos, após coloração com HE, apresentaram crescimento de um estroma fibrovascular nos três intervalos de tempo estudado (4, 7 e 14 dias após o implante). O modelo empregado para avaliação da angiogênese inflamatório na presença de antígenos do *T. cruzi* – utilizando-se a cepa Y do parasito – foi satisfatório por demonstrar que moléculas antigênicas deste protozoário são capazes de promover o aumento do fator de crescimento endotelial, não se sabe ainda se diretamente ou se indiretamente via ativação de outras células imunes. Já no 1º dia pós-implante, a presença destes antígenos promove um recrutamento celular observado no 4º dia após a cirurgia. Este infiltrado caracteriza-se fenotipicamente por neutrófilos, mas já uma parcela de macrófagos recrutados. A presença deste antígeno bruto, administrado 24 horas após o implante, foi capaz de alterar a resposta inflamatória local no 7º dia culminando no ápice do recrutamento de macrófagos para a matriz da esponja e na elevada produção de mediadores inflamatórios como TNF-alfa, CCL2, CCL5 e VEGF. Estes mediadores provavelmente exacerbam a resposta inflamatória local culminando na deposição de colágeno local, mas também com a formação de neovasos numa etapa posterior do modelo – 14º dia pós-implante.

Nas observações morfohistológicas foi demonstrado que o tecido fibrovascular ocupou progressivamente os poros da matriz esponjosa preenchendo os implantes com células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas. O tecido de granulação nos implantes do grupo estimulado era mais denso e mais vascularizado, em comparação ao grupo controle.

No presente trabalho, mostramos que o antígeno bruto das formas tripomastigota sanguínea da cepa Y do *T. cruzi* apresenta potencial indutor de angiogênese, inflamação e/ou fibrogênese induzida por implante de esponja em camundongos, como

esquemático na figura 9. O principal mérito desse trabalho foi mostrar, pela primeira vez, que os antígenos exercem efeitos no recrutamento de células inflamatórias e seus produtos solúveis (mediadores inflamatórios e angiogênicos), acarretando assim, a formação de novos vasos. Além disso, estes resultados abrem novas perspectivas de estudo da angiogênese em tecido cardíaco de animais no modelo experimental da doença de Chagas e indica que o papel dos antígenos do *T. cruzi* nos múltiplos componentes da angiogênese inflamatória reveladas neste estudo proveem evidências adicionais do potencial pró-angiogênico de outras cepas do parasito.

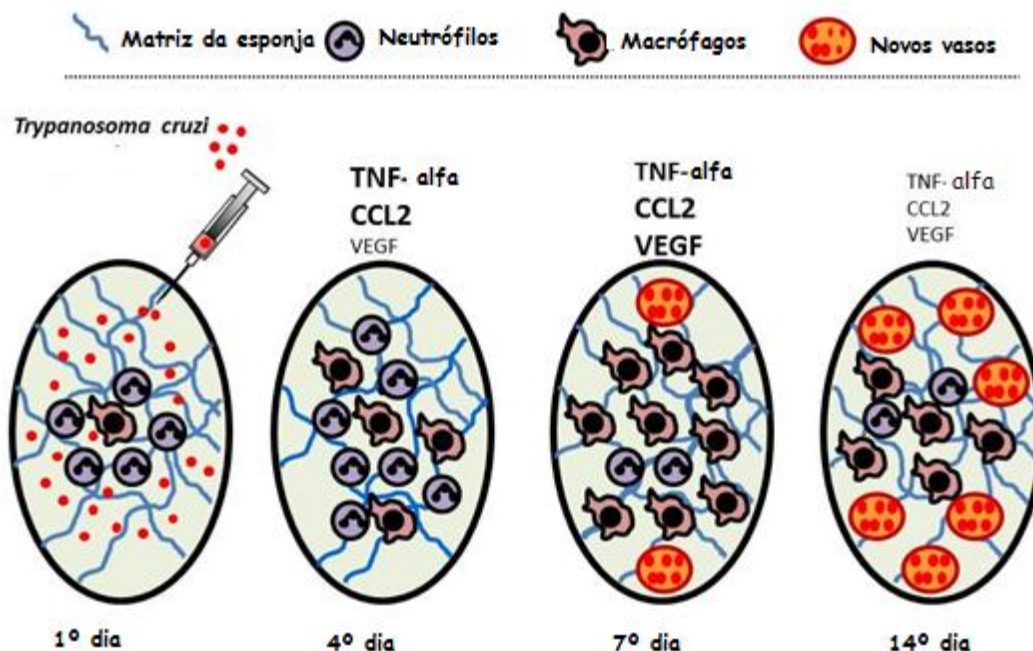


Figura 9. Esquema representativo do recrutamento celular e formação neovascular em esponjas de poliéster-poliuretano implantadas por via subcutânea e estimuladas com antígenos do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Em relação aos mediadores inflamatórios (TNF-alfa, CCL2 e VEGF), o tamanho da letra simboliza sua maior produção (letras maiores) ou menor produção (letras menores) nos respectivos dias avaliados.

De qualquer forma, torna-se evidente que a cepa Y do *T. cruzi* é capaz de induzir angiogênese local (modelo de esponja subcutânea). Porém, este padrão seria reprodutível no ambiente cardíaco? Haveria um processo de angiogênese no tecido inflamado e/ou em processo de fibrose? E qual seria o real papel desta angiogênese cardíaca: propiciar nutrientes para os cardiomiócitos em detrimento ou permitir um maior recrutamento celular local?

6 – Conclusões

Este estudo nos proporcionou as seguintes conclusões:

- (i) Modelo de implante de esponja de poliéster poliuretano subcutânea revelou ser um modelo eficiente para estudar a imunogenicidade e o mecanismo de angiogênese induzida por antígeno bruto das formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*;
- (ii) Antígeno bruto das formas tripomastigota sanguínea da cepa Y do *T. cruzi* induziram um aumento do recrutamento de monócitos/macrófagos para o sítio da matriz esponjosa no 7º dia pós-implante. Entretanto, os neutrófilos em duas semanas de implantação de esponja subcutânea não foram alterados no grupo estimulado pelos antígenos.
- (iii) A avaliação da deposição de colágeno nos dias determinados, não revelou diferença entre os grupos.
- (iv) Observou-se um aumento dos níveis de Fator de crescimento vascular endotelial no 7º dia e uma correlação com o aumento do conteúdo de hemoglobina no 14º dia no grupo estimulado com o antígeno, evidenciando a formação de novos vasos sanguíneos.
- (v) Antígeno bruto das formas tripomastigota sanguínea da cepa Y do *T. cruzi* aumentaram os níveis de mediadores inflamatórios (CCL2, CCL5, TNF-alfa) e angiogênicos (VEGF) no 7º dia pós-implante promovendo, conseqüentemente a angiogênese no 14º dia.
- (vi) Os parâmetros histomorfométricos revelaram um aumento da inflamação e da formação de novos vasos sanguíneos no 14º dia no grupo estimulado com o antígeno, concordando com os dados acima

7 – Referências Bibliográficas

Andrade S. P., Fan T. P., Lewis G. P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Pathol.*, 68:755-66, 1987.

Andrade, S. P., Machado, R. D. P., Teixeira, A. S., Belo, A. B., Tarso, A. M., Beraldo, W. T. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc. Res.*, 54: 253-261, 1997.

Araújo, F. A., Rocha, M.A., Mendes, J.B., Andrade, S.P. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- β 1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64: 29-34, 2010.

Aremberg, D. A.; Polverini, P. J.; Kunkel, S. L.; Shanafelt, A.; Strieter, R. M. In vitro and vivo systems to assess role of CXC chemokines in regulation of angiogenesis. *Methods Enzymol.*; 288: 190-220, 1997.

Ausprunk, D. H. & Folkman, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.*; 1: 53-65, 1977.

Alicia S. Chung e Napoleone Ferrara M. D. The extracellular matrix e angiogenesis: Role of the extracellular matrix in developing vessels and tumor angiogenesis. *ECN e Angiogênese*; 11: 2-5, 2010.

Adair, T. H. & Montani, J-P. Angiogenesis. Morgan e Claypool Life Sciences series, 2011.

Antonella Naldini e Fabio Carraro. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Current Drugs Targets - Inflammation e Allergy*; 4: 3-83, 2005.

Barcelos L. S., Talvani A., Teixeira A.S., Cassali G.D., Andrade S.P., Teixeira M.M. Production and *in vivo* effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res* 53: 576-584, 2004.

Barcelos L. S, Talvani A, Teixeira A.S, Vieira L.Q, Cassali G.D., Andrade S.P., Teixeira M. M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol* 78: 352-358, 2005.

Bailey, P. J. Sponge implants as models. *Methods Enzymol.*; 162: 327-334, 1988.

Bagli, E., A. Xagorari, *et al.* Angiogenesis in inflammation. *Autoimmun. Rev.*, v.3: 26. 2004.

Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Sher, A. Cuttingedge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, 177: 3515–3519, 2006.

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

Brener Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 59: 19-26, 1965.

Bradey, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.*, 78: 206-209, 1982.

Belo, A. V., Barcelos, L. S., Teixeira, M. M., Ferreira, M. A., Andrade, S. P. Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumor growth in mice. *Cancer Invest.*, 22: 723-729, 2004.

Benelli, R.; Lorusso, G.; Albin, A.; Noonan, D. M. Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Curr. Pharm. Des.*; 24: 3101-3115, 2006.

Bischoff, J. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest.*, 100: 37-9, 1997.

Bischoff, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol*, 5: 69-74, 1995.

Carmeliet, P., Moons, L. & Collen, D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res.*, 39: 8-33. 1998.

Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.*; 6:389-395, 2000.

Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., Gazzinelli, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.*; 167: 416-423, 2001.

Campos M.A., Gazzinelli R.T. Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm.*, 13:139-143, 2004.

Campos, P. P., S. P. Andrade, et al. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histol Histopathol*, 21,12: 1263-70, 2006.

Camargo M.M., Almeida I.C., Pereira M.E., Ferguson, M.A.J., Travassos, L.R., Gazzinelli R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* tripomastigotas initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immun.*; 158: 6131-6139, 1997.

Caldas I. S., Talvani A., Caldas S., Carneiro C. M., de Lana M., da Matta Guedes P. M., Bahia M. T. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res* 103: 413-421, 2008.

Carrera-Silva E. A., Carolina C. R., Natalia G., Pilar A. M., Andrea P., Gea S. TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/C and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Mol Immunol*. 45:3580-8, 2008.

Charo, I. F. & Ransohoff, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.*; 6: 610-621, 2006.

Charo, I. F. & Taubman, M. B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.*; 9: 858-866, 2004.

Conway, E. M.; Collen, D.; Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.*; 3: 507-521, 2001.

Colville-Nash, P. R., Alam, C. A., Appleton, I., Brown, J. R., Seed, M. P. & Willoughby, D. A. The pharmacological modulation of angiogenesis in chronic granulomatous inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.*, 274:1463-72, 1995.

Coelho O. S., Klein A., Talvani A., Coutinho S. F., Takeuchi O., Akira S., Silva J. S., Canizzarro H., Gazzinelli R. T., Teixeira M. M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol* 71:837-844, 2002.

Cross, A. S., S. Sakarya. Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. *J Biol Chem.*, 278: 4112-20. 2003.

Chagas C. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.

Coelho, P. S., Klein, A., Talvani, A., Coutinho, S. F., Takeuchi, O., Akira, S., Silva, J. S., Canizzarro, H., Gazzinelli, R. T., Teixeira, M. M. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolate from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induced in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J. Leukoc. Biol.*; 71: 837-844, 2002.

D'amore, P. A. & Thompson, R. Mechanisms of angiogenesis. *Ann. Rev. Physiol.*; 49: 453-464, 1987.

De Souza, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.*, 86: 197 – 283, 1984.

Dvorak, H. F. Angiogenesis : update. *J Thromb Haemost.*, 8: 1835-1842, 2005.

Dvork, H. F. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *American Journal Pathology.*, 162: 1747-1757, 2003.

Distler, J.W.; Hirth, A.; Kurowska-Stolarska, M.; Gay, R.E.; Gay, S.; Distler, O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med.*; 3: 149-161, 2003.

Engelhardt, E., Toksoy, A., Goebeler, M., Debus, S., Brocker, E. B. & Gillitzer, R. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.*, 153:1849-60, 1998.

Filho, G. B. Inflamações. In: Bogliolo Patologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 7ed., p. 130-174, 2006.

Folkman, J. & Haudenschild, C. Angiogenesis in vitro. *Nature*. 288: 551-556,1980.

Ferreira, M. A., Barcelos, L. S., Teixeira, M. M., Bakhle, Y. S., Andrade, S. P. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). *Life Sci.*, 81: 210-217, 2007.

Ferreira V., Molina M. C., Schwaeble W., Lemus D., Ferreira A. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends Parasit.* 21: 169-174, 2005.

Ferreira V., Molina M. C., Valck C., Rojas A., Aguilar L., Ramírez G., Schwaeble W, Ferreira A. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol* 40: 1279-1291, 2004.

Fernandez-Gomez, R., Esteban, S., Gomez-Corvera, R., Zoulika, K., Ouaisi, A. *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.*; 160: 3471-3479, 1998.

Gazzinelli, R. T., Rodrigues, M. M., Almeida, I. C., Travassos, L. R. Role of parasite surface glycoconjugates on induction/regulation of immune responses and inflammation, elicited during *Trypanosoma cruzi* infection: potencial implications on pathophysiology of Chagas' disease. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*,; 51: 411-428, 1999.

Gazzinelli R. T. e Denkers E. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Reviews. Immunol.*; 6: 895-906, 2006.

Gao, W., Pereira, M. A. *Trypanosoma cruzi* transialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.*, 31: 1503-1512, 2001.

Gerber, H. P.; Dixit, V.; Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor induced expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*; 273: 13313-13316, 1998.

Griffioen, A. W. & Molema, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev.*, 52: 237-68, 2000.

Grindlay, J. H. & Waugh, J. M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. *AMA Arch. Surg.*, 63: 288-297, 1951.

Grote K., Schutt H., Schieffer B. Toll-like receptors in angiogenesis. *The Scientific World Journal* 11: 981-991, 2011.

Grote K., Schutt H., Salguero G., Grothusen C., Jagielska J., Drexler H., Muhlradt P. F., Schieffer B. Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood* 115:2543-52, 2010.

Goede V., Brogelli L., Ziche M. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer*; 82: 765–770, 1999.

Hirschi, K. K. & D'amore, P. A. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS*; 79: 419-428, 1997.

Hu, D. E., Hiley, C. R., Smither, R. L., Gresham, G. A., Fan, T. P. Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. *Lab. Invest.*, 72: 601-610, 1995.

Hunter C.A., Slifer T, Araujo F. Interleukin-12 mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun* 64: 2381-2386, 1996.

Ingber, D. E.; Madri, J. A.; Folkman, J. A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology*; 4: 1768-75, 1986.

Jain R.K., Schlenger K., Hockel M., Yuan F. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med.*, 3,11:1203-8, 1997.

Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., et al., TLRdependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059–7066, 2006.

Kovacs, E. J. *Immunol. Today*; 12: 17-23, 1991.

Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Mitchell, R. N. *Inflamação aguda e crônica*. In: Robbins. *Patologia básica*. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda; p. 33-62, 2008.

Kumar, P. Shen, Q., Pivetti, C. D., Lee, E. S., Wu, M. H., Yuan, S. Y. *Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications inflammation* *Ex. Rev. Mol. Med.*, 11: 1-23, 2010.

Libby, P. *Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease*. *Nutr. Rev.*; 65: 140-146, 2007.

Liekens, S., De Clercq, E. & Neyts, J. *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. *Biochem Pharmacol*, 61, 253-70, 2001.

Luttikhuisen, D.T., Harmsen, M.C., Luyn, M.J.A.V. *Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction*. *Tissue Eng.*, 12: 1955-1970, 2006.

Lynch, C. N., Wang, Y. C., Lund, J. K., Chen, Y. W., Leal, J. A. & Wiley, S. R. *TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells*. *J Biol Chem*, 274: 8455-9, 1999.

Majno, G. *Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing*. *Am J Pathol.*, 153: 1035-9, 1998.

Marino, A.P., da Silva, A., dos Santos, P., Pinto, L.M., Gazzinelli, R.T., Teixeira, M.M. *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis*. *Circulation* 110: 1443–1449, 2004.

Maier, J. A., Morelli, D., Lazzerini, D., Menard, S., Colnaghi, M. I. & Balsari, A. Inhibition of fibronectin-activated migration of microvascular endothelial cells by interleukin-1alpha, tumour necrosis factor alpha and interferon gamma. *Cytokine*, 11, 134-9, 2001.

Mehrad B., Keane M. P., Strieter, R. M. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb H.*, 97: 755-762, 2007.

McGettrick, A.F., O'Neill, L.A. Localisation and trafficking of toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 22:20–27, 2010.

Mullane, K. M., R. Kraemer, et al. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods*, 14: 157-67. 1985.

Mendes, J. B., Campos, P. P., Ferreira, M. A., Bakhle, Y. S., Andrade, S. P. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J. Biom. Mat. Res. B. Appl. Biomater.*, 83: 408-425, 2007.

Melo L., Caldas I. S., Azevedo M. A., Gonçalves K. R., Nascimento A. F. S., Figueiredo V. P., Diniz L. F., Lima W. G., Torres R. M., Bahia M. T., Talvani A. Low doses of Simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Am J Trop Med and Hygiene* 84: 325-331, 2011.

Mendes, J. B., Campos, P. P., Rocha, M. A., Andrade, S. P. Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci.*, 84: 537-543, 2009.

Mendes, J. B., Campos, P. P., Ferreira, M. A., Bakhle, Y. S., Andrade, S. P. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J. Biom. Mat. Res. B. Appl. Biomater.*, 83: 408-415, 2007.

Michailowsky V., Silva N.M., Rocha C.D., Vieira L.Q, Lannes-Silva J., Gazzinelli R.T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitismo and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 159:1723-1733, 2001.

Mignatti, P. & Rifkin, D. B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme & Protein.*; 3: 117-137, 1996.

Mrowietz, U. & Boehncke, W. H. Leukocyte adhesion: a suitable target for anti-inflammatory drugs. *Curr. Pharm. Des.*; 12: 2825-2831, 2006.

Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature*; 6917: 846-852, 2002.

Nobuko Yoshida. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*; 1: 87-111, 2006.

Ouaissi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G. Magistrelli, G., Herbault, N. Thieblemont, N., Jeannin, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc-52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor-2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.*; 168: 6366-6374, 2002.

Phillips, C. L., Pfeiffer, B. J., Luger, A. M., Franklin, C. L. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). *Kidney Int.*, 62: 383-391, 2002.

Plunkett, M. L. e J. A. Hailey. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Lab Invest.*, 62: 507-510, 1990.

Pettersson, A., J. A. Nagy, et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest.*, 80: 99-115, 2000.

Rajotte, E.; Arap, W.; Hagedorn, M.; Koivunen, E.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J. Clin. Invest.*; 2: 430-437, 1998.

Rissau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*; 386: 671-674, 1997.

Ribatti, D., A. Vacca, *et al.* Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev.*, 100: 157-63. 2001.

Roesel, J. F. & Nanney, L. B. Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. *J Surg Res.*, 58: 449 - 59, 1995.

Saavedra, E., Herrera, M., Gao, W., Uemura, H., Pereira, M. A. The Trypanosoma cruzi trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulation interleukin 6 secretion in normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.*; 190: 1825-1836, 1999.

Salcedo R., Ponce M.L., Young H.A. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*; 96: 34-40, 2000.

Silva, G.K., Gutierrez, F.R., Guedes, P.M., Horta, C.V., Cunha, L.D., Mineo, T.W., et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against Trypanosoma cruzi infection. *J. Immunol.* 184: 1148-1152, 2010.

Silva J. S., Vespa G. N. R., Cardoso M. A. G, Aliberti, J. C, Cunha, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to in mice by inducing nitric oxide production in infected INF- γ - activated macrophages. *Infect. Immun.*; 63: 4862-4867, 1995.

Szekanecz, Z. e A. E. Koch. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum Dis Clin North Am*, v.30, n.1, Feb, p.97-114. 2004.

Talvani A., Teixeira M.M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Adv Parasitology* 76: 171-194, 2011.

Talvani, A., Coutinho, S.F., Barcelos, L.S., Teixeira, M.M. Cyclic AMP decreases the production of NO and CCL2 by macrophages stimulated with *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins. *Parasitol. Res.* 104: 1141–1148, 2009.

Talvani, A., Machado, F.S., Santana, G.C., Klein, A., Barcelos, L., Silva, J.S., et al., Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect. Immun.* 70: 4247–4253, 2002.

Talvani A., Ribeiro C.S., Aliberti J.C.S., Michailowsky V., Santos P.V., Murta S.M. Kinetic 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 and infection.* 2: 851- 866, 2000.

Talvani A., Teixeira M. M. Inflammation and Chagas disease: some mechanisms and relevance. *Adv Parasitology* 76: 171-194, 2011.

Tracey, K. J. The inflammatory reflex. *Nature*; 6927: 853-859, 2002.

Vekemans, J., Truevens, C., Solano, M., Torrico, M. C., Rodriguez, P., Alonso-Veja, C., Carlier, Y. Trypanosoma cruzi infection upregulates capacity of uninfected neonate cells to produce pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect. Immun.*; 68: 5430-5434, 2000.

Veale, D. J. e U. Fearon. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 20: 941-7, 2006.

Visser, K.; Eichten, A.; Coussens, L. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer*; 6: 24-37, 2006.

Wheeler-Jones, C.; Abu-Ghazaleh, R.; Cospedal, R.; Houlston, R. A; Martin, J. Zachary, I. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett.*; 1: 28-32, 1997.

Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W. Vascular-specific growth factor and blood vessel formation. *Nature*, 407: 242-248, 2000.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Da Campbell, Chiaris E., Fernandes, O., Guhl F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles M. A. Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104: 1051-1054, 2009.

Anexo: Prêmio Walter Colin – Sociedade Brasileira de Protozoologia