

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

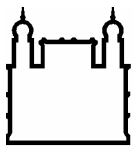
“Participação da molécula Fas-L na miocardite aguda promovida pela infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: regulação inflamatória celular e evolução da insuficiência cardíaca”

Gabriel Melo de Oliveira

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Gabriel Melo de Oliveira

“Participação da molécula Fas-L na miocardite aguda promovida pela infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: regulação inflamatória celular e evolução da insuficiência cardíaca”

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Andréa Henriques-Pons

Co-orientadora: Dra. Tania Cremonini de Araújo-Jorge

RIO DE JANEIRO

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, G.M.

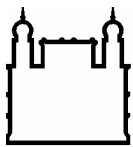
Participação da molécula Fas-L na miocardite aguda promovida pela infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: regulação inflamatória celular e evolução da insuficiência cardíaca

Gabriel Melo de Oliveira. Rio de Janeiro – IOC/FIOCRUZ, 2007

X 96p. il.

Tese – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

1. Morte celular 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Fas/Fas-L 4. Miocardite chagásica 5. Falência cardíaca 6. Tese (Doutorado. – IOC/FIOCRUZ) I. Título



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Gabriel Melo de Oliveira

“Participação da molécula Fas-L na miocardite aguda promovida pela infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: regulação inflamatória celular e evolução da insuficiência cardíaca”

ORIENTADOR (A): Dra. Andréa Henriques-Pons

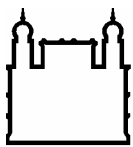
CO-ORIENTADOR (A): Dra. Tânia Cremonini de Araújo-Jorge

Aprovada em: __10__/_12__/_2007__

EXAMINADORES:

Prof. Dr.	Nome - Joseli Lannes Vieira
Prof. Dr.	Nome - Marcos Adriano da Rocha Lessa
Prof. Dr.	Nome- Nestor Schor
Prof. Dr.	Nome- Revisor: Luiz Anastácio Alves
Prof. Dr.	Nome- Suplente: Andréa Pereira de Souza
Prof. Dr.	Nome- Suplente: Solange Lisboa de Castro

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2007



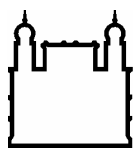
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

A molécula Fas-L é classicamente associada ao processo de apoptose e morte celular. Contudo, atualmente sabe-se que está envolvida também em vários mecanismos de regulação de imunidade adquirida e da resposta inflamatória, através de ativação celular e da secreção de fatores quimiotáticos, por exemplo. Além disso, esta molécula também parece estar envolvida na regulação sistêmica da função renal e cardíaca. Este trabalho tem o objetivo de estudar a importância da interação Fas/Fas-L na regulação inflamatória da miocardite aguda e também na evolução da insuficiência cardíaca em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Nossos resultados com animais deficientes em Fas-L mostraram menor intensidade da miocardite aguda e, conseqüentemente, redução na morte de cardiomiócitos. No entanto, houve alta mortalidade desses animais quando comparados com camundongos BALB/c. Observamos através de citometria de fluxo que na ausência da molécula há prevalência de linfócitos T CD4⁺ no tecido cardíaco e uma resposta mista Th1/Th2. Diferente dos animais selvagens infectados, que têm predomínio de células T CD8⁺ e perfil Th1. Aprofundamos o estudo sobre a causa da morte dos animais deficientes e observamos um comprometimento da função renal e cardíaca mais grave e mais precoce possivelmente relacionado ao óbito. Além disso, houve alterações adicionais na pressão arterial, na condução elétrica cardíaca e na hematologia de ambas as linhagens. Concluímos assim que a molécula Fas-L não está diretamente envolvida na destruição de fibras musculares cardíacas, mas atua localmente regulando o equilíbrio e padrão de citocinas e infiltração inflamatória celular. Atua também de forma sistêmica promovendo uma insuficiência cardíaca fulminante por uma síndrome cardio-anêmica-renal.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

The Fas-L molecule is classically associated with apoptosis and cellular death. However, it is also known that this molecule is involved in various regulatory mechanisms of acquired immune and inflammatory responses, through cellular activation and secretion of quimiotactic factors, for example. In addition, this molecule is also apparently involved in a systemic regulation of cardiac and renal function. This work aims to study the importance of Fas/Fas-L interaction in the inflammatory regulation of acute myocarditis and in the progression of cardiac insufficiency in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Our results using Fas-L deficient mice showed a moderate acute myocarditis and, accordingly, reduction in cardiomyocytes death. However, there was a high mortality rate when compared with BALB/c mice. We observed through flow cytometry that in the absence of Fas-L there are mostly CD4⁺ T cells in the cardiac tissue and a Th1/Th2 response. Differently from the wild type infected mice, which have predominantly CD8⁺ T and a Th1 biased response. We further studied the cause of death of deficient mice and observed a more pronounced and earlier cardiac and renal dysfunction possibly related to death. Moreover, there were additional alterations in arterial pressure, cardiac electric conduction and hematological evaluation of both mice lineages. We concluded that the Fas-L molecule is not directly involved in cardiomyocytes destruction, but acts locally regulating the equilibrium and profile of cytokines and cellular inflammatory infiltration. Additionally, Fas-L acts systemically promoting a fulminant cardiac insufficiency through a cardio-anemic-renal syndrome.

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Biologia Celular** do **Instituto Oswaldo Cruz** da **Fundação Oswaldo Cruz** sob orientação das Dras. Andréa Henriques-Pons e Tania Cremonini de Araújo-Jorge, financiado pelas seguintes entidades:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento a Pesquisa (CNPq)
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

O objetivo primordial deste trabalho é acrescentar conhecimentos ao estudo da doença de Chagas para que se reverta em melhoria das condições de tratamento de pacientes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (que não são poucos) e conseqüentemente o aumento da qualidade de vida destas pessoas.

Desta maneira, agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente na produção desta tese e que acreditam que através do trabalho é possível melhorar as condições de vida de outro ser humano e de si próprio. Além disso, a todos que não participaram deste trabalho, mas que estão juntos na caminhada...

Ao final deste trabalho, meu agradecimento especial a Dra. Andréa Henriques-Pons pela minha formação profissional, desde antes do mestrado até o doutorado. Obrigado por tudo... A Dra. Tania Cremonini de Araújo-Jorge por toda a ajuda e as oportunidades que propiciaram o meu crescimento profissional.

*Um tísico à míngua espera a tarde inteira pela assistência que não vem,
Mas vem de tudo n'água suja, escura e espessa deste Rio Severino, Morte e Vida vêm,
Mas quem não tem ABC não pode entender HIV nem cobrir, evitar e ferver,
O rio é um rosário cujas contas são cidades,
À espera de Deus que dê quem possa lhes dizer,
Me diz o que é que você tem... O que é que eu posso te dizer?*

Herbert Vianna – Rio Severino

INDICE

I – Introdução.....	1
1. A Doença de Chagas.....	2
1.1. Aspectos gerais.....	2
1.2. Características da infecção.....	3
1.3. A fase aguda.....	4
1.4. Miocardite Chagásica Aguda.....	5
1.4.1. Aspectos gerais.....	5
1.4.2. Aspectos imunológicos da fase aguda.....	6
2. Morte celular.....	8
3. Inflamação.....	9
4. Molécula Fas-L e regulação inflamatória.....	12
4.1. Fas-L e miocardite aguda.....	12
4.2. Fas-L e a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	13
5. Insuficiência cardíaca – Características gerais.....	15
5.1. A miocardite aguda e a insuficiência cardíaca.....	16
5.2. Insuficiência cardíaca e falência renal.....	17
5.3. Falência renal e Fas-L.....	18
5.4. Falência renal e doença de Chagas.....	19
6. Objetivos.....	21
 Artigo I: <i>Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by <u>Trypanosoma cruzi</u> infection.....</i>	 22
Artigo II: <i>Renal/Cardiac failure in acute <u>Trypanosoma cruzi</u> infection and Fas-L influence.....</i>	 23
II. Discussão.....	24
III. Conclusões.....	35
IV. Bibliografia.....	37

ABREVIATURAS

Poros PT.....	<i>Poros de permeabilidade transitória</i>
FAK.....	<i>Cinase de adesão focal</i>
hsp.....	<i>heat shock protein</i>
MLCK.....	<i>myosin light chain kinase</i>
CAD.....	<i>caspase activated deoxyribonuclease</i>
Fas-L	<i>ligante da molécula Fas</i>
FADD.....	<i>Fas-associated death domain</i>
TCR.....	<i>T cell receptor</i>
Célula NK.....	<i>Natural Killer</i>
GAL.....	<i>galactose/N-acetil-galactosamina</i>
gld (-/-).....	<i>camundongos deficientes na expressão de Fas-L</i>
APC.....	<i>antigen preseting cell</i>
AICD.....	<i>activation-induced cell death</i>
BCR.....	<i>B cell receptor</i>
FcR.....	<i>receptor Fc</i>
NO.....	<i>óxido nítrico</i>
iNOs.....	<i>óxido nítrico sintase induzida</i>
MMP.....	<i>metaloproteinases de matriz</i>
TIMP.....	<i>sistema de inibidores teciduais de MMP</i>
ACE.....	<i>angiotensin converting enzyme</i>
DN.....	<i>Células com fenótipo duplo negativo CD3⁺/CD4⁻/CD8</i>
DISC.....	<i>death-inducing signaling complex</i>

INTRODUÇÃO

1. A doença de Chagas:

1.1. Aspectos gerais:

Em 1909, Oswaldo Cruz anunciou formalmente na Academia Nacional de Medicina a descoberta da Tripanossomíase Americana, chamada posteriormente de *moléstia de Chagas*. O médico sanitarista Carlos Chagas realizou um feito único na história médica mundial, onde descobriu o parasito *Trypanosoma cruzi*, seu ciclo evolutivo, o vetor e seus hábitos, seus reservatórios, além da própria doença. O processo da descoberta se iniciou em 1907 quando Carlos Chagas, pesquisador de Manguinhos, chegou ao norte de Minas Gerais com a missão de combater a malária entre os trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil. Lá, sua atenção foi despertada por um inseto que proliferava nas frestas das paredes de pau-a-pique das casas, alimentando-se à noite do sangue de seus moradores. Por atacar preferencialmente o rosto, era chamado de *barbeiro* pela população local (Coutinho e cols., 1999).

A distribuição geográfica da doença, com transmissão natural, inclui todos os 17 países das Américas Central e do Sul e coloca em risco de transmissão um quarto da população da América Latina. Estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas e cerca de 100 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção na América Latina. A doença de Chagas mata cerca de 50 mil pessoas todos os anos no continente americano e é a terceira enfermidade tropical em prevalência, depois da malária e da esquistossomose (sítio: *Drugs for neglected diseases initiative* – DNDi, 2007).

Estima-se que no Brasil haja quatro milhões de pacientes infectados pela doença e, apesar da recente notificação da interrupção da transmissão pelo vetor *Triatoma infestans* (uma das espécies do *barbeiro*) no país, outras espécies de triatomíneos continuaram a transmitir a doença. Várias ocorrências da doença de Chagas têm sido registradas nas duas últimas décadas na Amazônia através de levantamentos sorológicos, diagnósticos de casos isolados ou as chamadas microepidemias pela infecção por via oral e existe uma

preocupação cada vez maior com o risco de endemização da doença nessa região. (Sítio: Médicos sem Fronteiras *on line*, 2007).

Como parâmetro de comparação, a cada ano morrem no Brasil cerca de 12 mil pessoas em consequência da infecção por HIV, segundo o mais recente boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (Szwarcwald e cols., 2000). As vítimas da doença de Chagas são mais que o dobro, correspondendo a 33 mil óbitos. Entretanto, as políticas adotadas para o combate das duas doenças são bem diferentes. Enquanto são destinados US\$ 300 milhões por ano para a primeira, os recursos para o controle da doença de Chagas chegam a no máximo US\$ 20 milhões (sítio: *Notícias on line* - Faculdade de Medicina – UnB, 2005). Desta forma, a doença de Chagas pode ser classificada como *doença negligenciada*. Essas doenças são definidas como patologias que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, mas que não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Apesar de quase cem anos da rápida e eficiente descrição desta doença e um grande volume de trabalhos científicos que tratam da biologia, imunologia e genética do parasito causador, todo esse conhecimento não consegue se reverter em novas ferramentas terapêuticas para as pessoas afetadas. Sugere-se que uma das causas seja essencialmente porque as pessoas que sofrem destas doenças são pobres e não oferecem um retorno lucrativo suficiente para que a indústria farmacêutica invista em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Contraditoriamente, essa doença, promove um alto impacto ao sistema público de saúde e a previdência social, uma vez que afeta os pacientes na sua fase mais produtiva da vida (sítio: *Drugs for neglected diseases initiative* – DNDi, 2007). Desta maneira, toma-se imprescindível a diminuição do hiato entre a pesquisa básica e à pré-clínica, assim como a aproximação entre o setor público e a iniciativa privada. Devem, portanto, se implantadas políticas públicas de saúde voltadas para programas eficazes de erradicação e tratamento de doenças de interesse à toda população (sem discriminação econômica), diminuindo seu impacto nos próprios gastos públicos. (Prata, 2001)

1.2. Características da infecção:

A doença de Chagas possui como vetor invertebrado o inseto hematófago triatomíneo que pertence à ordem Hemíptera, apresentando como os mais importantes do

ponto de vista da transmissão os gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Lent, 1999). A forma replicativa do parasito no hospedeiro invertebrado é chamada de epimastigota e no hospedeiro vertebrado é chamada de amastigota. A forma infectante deste protozoário é denominada de tripomastigota metacíclica e é encontrada na porção final do intestino do inseto vetor, sendo liberada quando da defecação que ocorre após o repasto sangüíneo do inseto. A transmissão natural do *T. cruzi* ocorre durante a alimentação do inseto hematófago, que deposita as fezes contendo a forma infectante do parasito na pele. Através da lesão provocada pela picada do inseto ou pelo espalhamento para áreas feridas ou para mucosas, o parasito alcança o tecido subjacente e a corrente sanguínea do hospedeiro.

A doença apresenta uma fase aguda de curta duração com sintomatologia inespecífica e frequentemente branda, que passa na maioria das vezes despercebida. No local da picada pode desenvolver uma lesão volumosa, eritematosa e edematosa chamada de *chagoma* de inoculação e se o material infectante for levado ao olho, há a ocorrência de uma conjuntivite com edema da pálpebra, também conhecido por *senal de Romana*, cuja duração por mais de 30 dias permite diferenciação clara das conjuntivites virais e bacterianas (Prata, 2001). A fase crônica inicia-se com um período assintomático de duração variável que pode durar mais de 30 anos e aproximadamente 30 a 40% dos pacientes infectados desenvolvem a forma sintomática crônica (Moncayo, 2003). A sintomatologia é variada e de alta morbidez, podendo desenvolver a forma neuronal em aproximadamente 3% dos casos, cardiomiopatia em 25-30% dos casos ou dilatação do trato digestivo (megaesôfago ou megacólon) em 6% dos pacientes. Nesse estágio, a doença é frequentemente fatal nos pacientes cardiopatas devido à insuficiência cardíaca. Há ainda frequentemente casos de morte súbita, devido à destruição do sistema de condução elétrica cardíaco (revisto por Dias e Coura, 1997).

1.3. A fase aguda:

Como descrito acima, a fase aguda é majoritariamente branda e inespecífica em cerca de 90% dos casos. Nos casos agudos sintomáticos da doença de Chagas cursam com febre, mialgia, prostração, hepatoesplenomegalia, efusão pericárdica e miocardite aguda. Em

alguns casos pode ocorrer o quadro de meningoencefalite, mas algum nível de envolvimento do sistema cardiovascular, ainda que discreto, está presente em aproximadamente 90% dos casos (Parada e cols., 1997). Os linfonodos situados entre a artéria aorta e pulmonar se encontram infartados e as alterações morfológicas cardíacas são resultado da resposta inflamatória (miocardite aguda) possivelmente devido à ruptura celular pela multiplicação parasitária no estágio inicial e antígenos (Teixeira e cols., 2006). Microscopicamente, diversas fibras musculares e ocasionalmente histiócitos intersticiais demonstram ninhos com divisão de formas amastigotas. Além disso, a inflamação pode estender-se para os nervos simpáticos no epicárdio e propriamente à região intramural (Teixeira e cols., 2006).

O diagnóstico é estabelecido clinicamente em menos de 10% dos casos em áreas não endêmicas, provavelmente por causa da inespecificidade dos sintomas. Fixação de complemento e outros testes sorológicos para *T. cruzi* são normalmente negativos durante a primeira semana de infecção, embora parasitos circulantes possam ser observados e, em estágios mais tardios, diagnosticados por xenodiagnóstico (Punukollu e cols., 2007). O diagnóstico por PCR pode indicar casos bem recentes (Antas e cols., 1999). Achados laboratoriais também não são específicos no início e incluem leucocitose com aumento absoluto de linfócitos. A eletrocardiografia pode sugerir onda T e intervalo ST e QRS de baixa voltagem e com outras alterações na condução elétrica cardíaca como taquicardia sinusal discreta e bloqueio atrioventricular de primeiro grau. Além disso, através de radiografia pode ser observado o aumento da silhueta cardíaca em diversos padrões (Teixeira e cols., 2006).

Os mecanismos que regulam o desenvolvimento de sintomatologia crônica ainda se encontram em amplo debate. Aparentemente, seja qual for o mecanismo que module a transição entre a forma assintomática para a sintomática crônica, a patogenia desta fase parece estar relacionada à presença e quantidade do parasito (Higuchi e cols., 2003) e também com a gravidade da miocardite durante a fase aguda (Prata e cols., 2001). Além disso, Jones e cols., 1993 e Vago e cols., 1996 detectaram DNA de *T. cruzi* somente em órgãos com apresentação grave da patologia. Marinho e cols., em 1999, demonstraram que em camundongos, a carga parasitária durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*

correlaciona-se diretamente com a patologia tecidual e ativação do sistema imune na fase crônica. Os pacientes que sobrevivem à fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* desenvolvem resposta imune específica ao parasito, reduzindo sua quantidade na corrente sanguínea e nos tecidos (Marinho e cols., 1999).

1.4. Miocardite Chagásica Aguda:

1.4.1. Aspectos gerais:

Na fase aguda normalmente há associação entre ninhos de parasitos e infiltração inflamatória. Entretanto embora na fase crônica da infecção também haja infiltração inflamatória, há raros ninhos de parasitos (Higuchi e cols., 2003).

A invasão do cardiomiócito pelo *T. cruzi* ocorre através da endocitose, com a ligação e a internalização do parasito mediada por diferentes componentes da superfície celular capazes de reconhecer a forma tripomastigota. O mecanismo de invasão do *T. cruzi* nas células cardíacas é essencialmente semelhante ao mecanismo de invasão das células fagocíticas profissionais, envolvendo açúcares, lectinas, glicosidases, proteinases e inibidores de proteinases (Meirelles e cols., 1999; Soeiro e cols., 1999). Também é observado que o relativo balanço entre a exposição de ácido siálico e resíduos de galactose/N-acetil-galactosamina (GAL) na superfície do parasito determina a capacidade de invadir o miócito. O parasito necessita de um processo proteolítico entre a sua superfície e a das células cardíacas para expor os ligantes necessários e os receptores para sua adesão e internalização (Araújo-Jorge e cols., 1992).

As formas amastigotas do *T. cruzi* multiplicam-se nos cardiomiócitos causando a ruptura de algumas fibras, mas sobretudo a exposição de antígenos e liberação de mediadores inflamatórios de diversos tipos (Teixeira e cols., 2006). São vistas inicialmente reações focais seguidas por infiltração difundida por todo o miocárdio poucos dias após a inoculação experimental. Algumas vezes são encontrados focos isolados de necrose em cardiomiócitos aparentemente não parasitados. Além da adesão de células mononucleares (como linfócitos T, células NK e também macrófagos) à membrana dos cardiomiócitos, há destruição de retículo sarcoplasmático, de miofibrilas, de mitocôndrias e de discos

intercalares. Algumas hipóteses têm sido levantadas para justificar estes danos cardíacos, mas as principais são: a) lesão imunológica induzida por antígenos do *T. cruzi* em células parasitadas e não parasitadas (Ribeiro dos Santos e Hudson, 1980) e b) lesão por isquemia devido à agregação plaquetária, à obstrução dos capilares do miocárdio e alterações da microcirculação (Tanowitz e cols., 1990, Rossi e Ramos, 1996). Esta microangiopatia consiste no comprometimento capilar do miocárdio com microdilatações, microespasmos e alterações endoteliais (Rossi e Bestetti, 1995), sendo encontrados linfócitos e macrófagos aderidos às células endoteliais (Andrade e cols., 1994). Além disso, o comprometimento vascular na miocardite chagásica aguda está normalmente associado à grave fibrose miocárdica (Tanowitz e cols., 1992).

1.4.2. Aspectos imunológicos da fase aguda:

A resposta imune humoral e celular em relação à infecção do hospedeiro vertebrado possui aspectos relevantes na fisiopatologia da doença. As células T CD4⁺ Th1 são muito importantes para a proteção contra o *T. cruzi* (Hoft e cols., 2000). As células NK T, com produção de interferon- γ (IFN- γ), e macrófagos também são elementos importantes que participam do controle da replicação parasitária durante a fase aguda da infecção (Silva e cols., 1995). A depleção de Linfócitos CD8⁺ antes da inoculação do parasito resulta em um aumento da parasitemia e da mortalidade de camundongos (Tarleton e cols., 2000). A inoculação do *T. cruzi* em camundongos resistentes ou susceptíveis demonstrou que células Th1 são determinantes para o caráter de proteção do sistema imune (Minoprio e cols., 1986). Há intensa resposta anti-parasitária por células T CD4⁺ e CD8⁺ e também podemos destacar a função de IL-12 (interleucina-12), INF- γ e iNOS (óxido nítrico sintetase induzida) (Silva e cols., 2003), por sua vez antagonizada pela ação de IL-10 (interleucina-10) e IL-4 (Interleucina-4) (Michailowsky e cols., 2001), no controle da parasitemia, da inflamação e da resistência à infecção pelo hospedeiro. Estudos experimentais em roedores infectados com várias cepas de *T. cruzi* mostraram o envolvimento de diversas citocinas e tipos celulares na modulação da proteção durante a fase aguda. Em camundongos, durante a fase inicial da infecção, os macrófagos podem responder à presença das formas tripomastigotas de maneira dependente de *Toll-like receptor* (TLR) e Myd88 e produzir citocinas como IL-12 e TNF- α (Fator alfa de necrose tumoral) que facilitam a polarização

de células T CD4⁺ e CD8⁺ e a produção de INF- γ (Campos e Gazzinelli., 2004), que é essencial para o controle da infecção (Brenner e Gazzinelli, 1997; Martin e Tarleton, 2004). Macrófagos ativados por TNF- α e INF- γ possuem uma importante função no controle do crescimento e replicação parasitária e diversos estudos mostram que o óxido nítrico (NO) derivado destas células possui papel central neste contexto (Silva e cols., 2002). Várias citocinas, especialmente IL-10 e IL-4, possuem um importante envolvimento na redução da resposta imune do tipo Th1 (Soares e cols., 2001; Silva e cols., 1992).

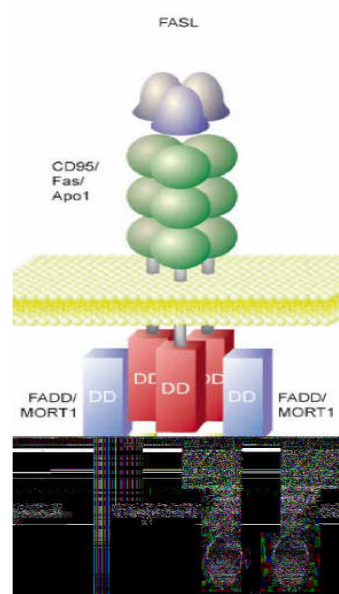
As quimiocinas também aparecem como um importante fator no mecanismo de regulação imune, ativação leucocitária, coestimulação e diferenciação durante a resposta imune inata e adquirida (Sallusto e cols. 2000, Gerard e Rollins 2001). Estudos demonstraram que macrófagos (Villalta e cols., 1998) e cardiomiócitos infectados *in vitro* com *T. cruzi* (Machado e cols, 2000) e *in vivo* (Silva e cols., 1995) produziram RANTES, MIP-1 α e JE/MCP-1, aumentaram os níveis de NO e controlaram a multiplicação dos parasitos (Aliberti e cols.,1999). Estes dados foram obtidos utilizando também camundongos deficientes na produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , que são essenciais para a produção de RANTES e MIP-1a respectivamente (Aliberti e cols., 2001). Também, a adição de IFN- γ em estudos *in vitro* aumentou os níveis da produção de RANTES e IP-10 em macrófagos infectados por *T. cruzi* (Talvani e cols., 2000, Aliberti e cols., 2001). Além disso, cardiomiócitos ativados *in vitro* produzem TNF- α , iNOs e quimiocinas, participando ativamente do controle da infecção intracelular e influxo de células inflamatórias (Machado e cols., 2000). A patogênese cardíaca da doença de Chagas pode estar direcionada pela predominância de células T CD8⁺ no miocárdio infectado, sendo reflexo de um perfil de moléculas de adesão, citocinas e receptores para quimiocinas que contribuem para a gênese e manutenção da miocardite chagásica (Lannes, 2003). Embora mecanismos autoimunes já não sejam mais considerados tão determinantes de lesões miocárdicas, ensaios *in vitro* sugerem que anticorpos anti-receptores β -adrenérgicos (Borda e cols., 1991) podem influenciar na evolução da disfunção cardíaca (Sterin-Borda e Borda, 2000). Todos estes mecanismos levam à morte de cardiomiócitos e outras células cardíacas, como células ganglionares parassimpáticas, eventos nos quais se baseia a progressão da cardiopatia.

2. Morte celular:

A morte necrótica é um evento celular dramático que consiste na ruptura das estruturas celulares e deflagração de resposta inflamatória local. Já a apoptose ou morte celular programada é um processo de morte bioquimicamente ativo (Malmusi e Ackerman, 2000, Danial e Korsmeyer, 2004). A apoptose caracteriza-se pela preservação da integridade das membranas plasmática e de organelas internas, não induzindo resposta inflamatória (Roos e cols., 2004). Há formação de projeções de membrana como bolhas (*blebs*), fragmentação, condensação e marginação da cromatina e formação dos chamados corpos apoptóticos (Haunstetter e Izumo, 1998). O estímulo apoptótico de membrana mais conhecido é a via deflagrada pela ativação da molécula Fas (CD95) pelo seu ligante Fas-L (CD95L) (Figura 1). Esta interação dispara a trimerização de monômeros de Fas na superfície da célula alvo com domínio de morte intracelular contendo aproximadamente 80 aminoácidos (Orlinick e cols., 1999). Imediatamente após a interação Fas/Fas-L ocorre o recrutamento de uma molécula adaptadora serino-fosforilada chamado FADD – (*Fas associated death domain*) (Figura 1). Após a chegada dessa molécula, há a oligomerização e ativação de moléculas de pró-caspase -8 e -10, possivelmente por autoclivagem ou clivagem por moléculas de caspases próximas. Após a ativação destas pró-caspases iniciais, há a ativação em cascata de outras pró-caspases em caspases funcionais e cada uma delas degrada alvos proteicos intracelulares pertinentes e pró-caspases. A ativação da pró-caspase-3, por sua vez, é um evento central na apoptose e promove a clivagem

de vários substratos, incluindo enzimas de reparo de DNA, como a poli-ADP ribose polimerase, proteínas estruturais. citoplasmáticas e nucleares, laminas e actina, I^{cad} e outros constituintes celulares (Buendia e cols., 2001, Bouchard e cols., 2003).

Atualmente está claro que as moléculas Fas e Fas-L são de extrema relevância no



controle da homeostase celular e no funcionamento do sistema imune.

Figura 1: Esquema da interação das moléculas Fas/Fas-L na superfície celular e recrutamento da molécula adaptadora FADD na ativação da caspase 8 (Adaptado de Delves e Roitt 2000). DD- Domínio de morte

Trabalhos anteriores utilizando camundongos deficientes para expressão de Fas (*lpr*) e Fas-L (*gld*) demonstraram uma severa linfoproliferação e aumento da susceptibilidade a carcinomas linfóides assim como vários tipos de autoimunidades (Sharma e cols., 2000). Há evidências de que a ativação de Fas/Fas-L pode também resultar em respostas não apoptóticas como proliferação celular, ativação de NF-kappaB (Wajant e cols., 2003) e outros. Linfócitos T citotóxicos expressam Fas-L que contribuem para sua função de citotoxicidade contra patógenos ou células tumorais e deleção clonal periférica (Nagata e Goldstein 1995). A expressão de Fas-L também tem sido detectada em tecidos considerados “imunologicamente privilegiados”, como olhos e testículos (Bellgrau e cols., 1995; Griffith e cols., 1995). Acredita-se que a expressão constitutiva de Fas-L nestes tecidos seja importante para prevenir a infiltração inflamatória de leucócitos através da indução de morte celular por apoptose (Walsh e Sata, 1999). De forma semelhante, algumas células tumorais expressam Fas-L e isto pode participar da evasão destas células do sistema imune (Hahne e cols., 1996; Niehans e cols., 1997; Strand e cols., 1996). Além disso, diversos trabalhos recentes têm mostrado que esta interação molecular atua também na secreção de citocinas e quimiocinas, quimiotaxia, transcrição gênica. Uma de suas funções mais intrigantes é a sua capacidade de atuar na modulação de respostas inflamatórias.

3. Inflamação:

A inflamação é uma resposta do tecido vivo vascularizado à lesão. É desencadeada por infecções microbianas, agente físico, substâncias químicas, tecidos necróticos ou reações imunes. A inflamação deve conter e isolar a lesão, destruir os microorganismos invasores e as toxinas inativas e preparar o tecido para o reparo. A inflamação aguda inicia-se rapidamente e tem a duração relativamente curta, envolvendo a exudação de líquido (edema) e migração de célula polimorfonuclear (neutrófilos) (Robbins e Cotran, 2002).

A função dos neutrófilos na resposta inflamatória depende de uma rápida transição de seu estado circulante não aderente para a ligação ao endotélio e diapedese. Os eventos

iniciais deste processo consistem no aparecimento de moléculas de adesão no endotélio adjacente induzidas por mediadores inflamatórios liberados pelo tecido lesado ou afetado (Figura 2). A etapa de rolamento de neutrófilos é mediada principalmente por L-selectina, na superfície das células inflamatórias, e por P- e E-selectinas que passam a ser expressas nas células endoteliais do sítio inflamatório. A P-selectina é mobilizada em poucos minutos para a superfície da célula endotelial devido ao estímulo promovido por trombina, histamina ou radicais de oxigênio, por exemplo, interagindo primariamente com o ligante semelhante à mucina PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), localizado no microvilo do leucócito (McEver e Cummings, 1997). O evento subsequente consiste no envolvimento de E-selectina, surgindo na superfície da célula endotelial uma a duas horas após o estímulo de IL-1, TNF- α ou LPS, por exemplo (Lawrence e Springer, 1993).

A cinética de recrutamento de neutrófilos analisada em camundongos deficientes na expressão de P-selectina e de L-selectina sugere uma contribuição seqüencial para o rolamento de leucócitos e que a L-selectina está envolvida no seqüestro de neutrófilos pela microvasculatura inflamada (Catalina e cols., 1999). Além disso, o endotélio dos capilares inflamados produz substâncias quimioativas como fator de ativação plaquetária (PAF), leucotrieno B4 e várias quimiocinas. Uma destas quimiocinas, a IL-8, atrai especificamente neutrófilos (Roth e cols., 1995), é armazenada nos corpúsculos de Weibel-Palade e é liberada após o estímulo por histamina e trombina (Utgaard e cols., 1998).

A forte adesão do neutrófilo às células endoteliais está relacionada à interação com as integrinas (Esquema 2) da subfamília $\beta 2$ (CD11a, CD11b, CD11c/CD18) com ICAM-1 e VLA-4 com VCAM-1. A ativação destas integrinas nos neutrófilos está relacionada a vários fatores como substâncias quimioativas (PAF, IL-8, fMLP, C5a), citocinas (TNF- α), fatores de crescimento (GM-CSF) e produtos bacterianos (LPS) (Witko-Sarsat e cols., 2000).

A migração transendotelial ocorre predominantemente nas bordas das células endoteliais através das junções de descontinuidade. O extravasamento requer, contudo, modificações das junções célula-célula no tecido endotelial e a estruturação está relacionada com componentes como VE-caderina, catenina e placoglobina observadas nas regiões de adesão entre os neutrófilos e as células endoteliais (Del Maschio e cols., 1996). Duas moléculas de adesão celular da superfamília-Ig (CAM – *cellular adhesion molecule*)

têm sido envolvidas na transmigração leucocitária, a molécula de adesão plaquetária das células endoteliais (PECAM-1 ou CD31) e a molécula de adesão juncional (JAM) (Martin-Padura e cols., 1998).

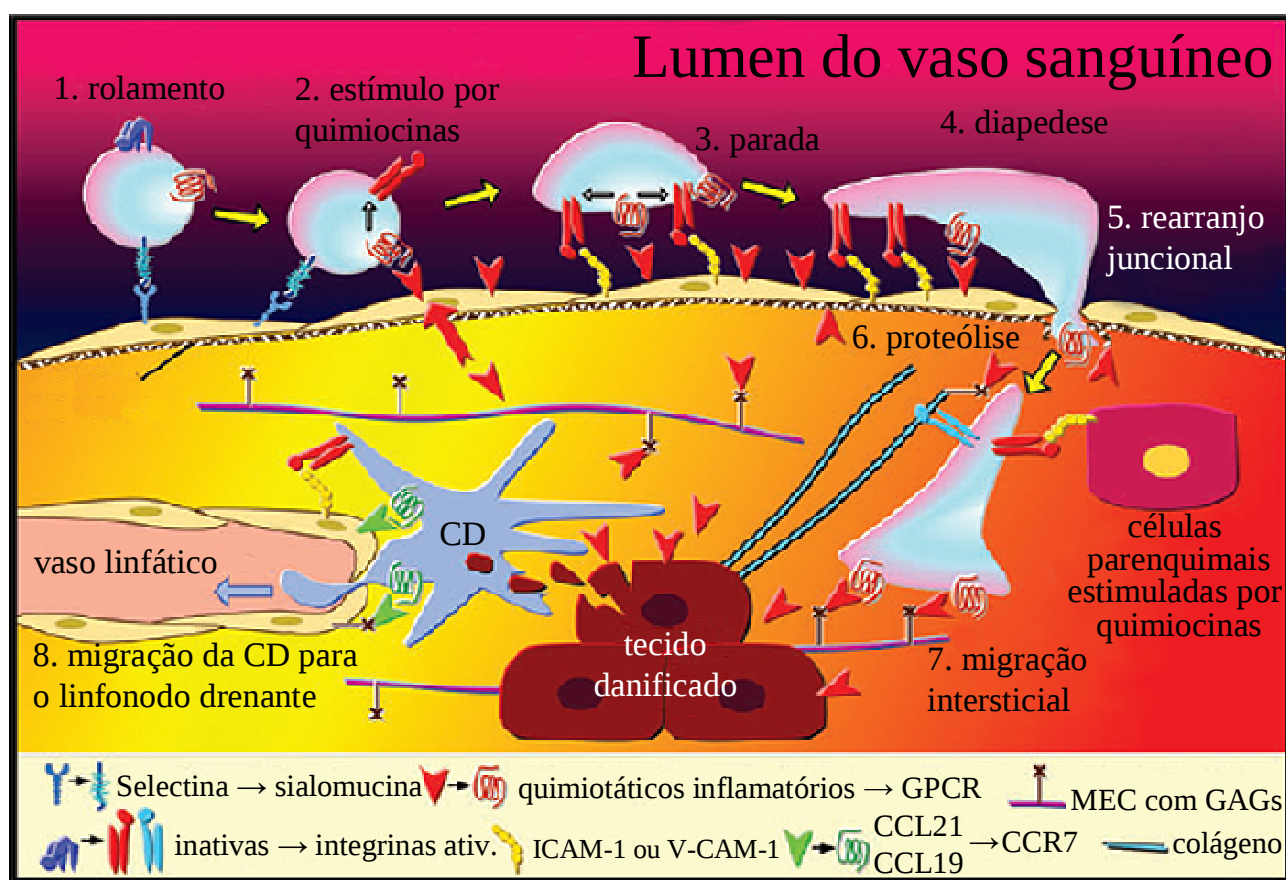


Figura 2: Resposta inflamatória aguda: Etapas para migração de leucócitos ao local da inflamação. A inflamação ocorre devido à lesão tecidual ou à infecção por patógenos, induzindo a liberação de citocinas substâncias quimioativas (cabeças de seta vermelhas) por células do

estroma, macrófagos e mastócitos. A sinalização da inflamação promove 1) a regulação positiva de selectinas e membros da superfamília de imunoglobulinas. 2) Substâncias quimioativas, principalmente quimiocinas (cabeças de setas verdes), são produzidas e translocadas através das vênulas endoteliais, promovendo a 3) adesão dos leucócitos (setas vermelhas). 4) A diapedese ocorre por um desarranjo transitório nas 5) junções endoteliais para a 6) penetração do leucócito obedecendo ao 7) gradiente quimioatrativo. Nos linfonodos, os antígenos processados pelas 8) células dendríticas ativam células T e expandem a produção de linfócitos para migrarem ao local da inflamação (Adaptado de Luster e cols, 2005).

4. Molécula Fas-L e regulação inflamatória:

A expressão de Fas/Fas-L em situações patológicas pode regular positivamente a resposta inflamatória (Miwa e cols., 1998). Recente trabalho de Reis e cols., 2004 discutiu evidências de sinais pró-apoptóticos da molécula Fas-L na regulação inflamatória da lesão na fibrose pulmonar. Os autores demonstraram que a sinalização de Fas-L induz apoptose em células epiteliais e macrófagos alveolares, com liberação de IL-1 e outras citocinas promovendo infiltração inflamatória. A sinalização de Fas-L é um importante evento no modelo de lesão aguda pulmonar, fibrose pulmonar idiopática e silicose. Dockrell em 2003 descreveu que a desregulação do sistema Fas/Fas-L contribui para a patogênese de doenças infecciosas, onde microorganismos podem inibir o sinal de transdução de Fas e prolongar a sobrevivência intracelular. Através desta descrição podemos observar o quanto é complexo o estudo sobre a molécula Fas-L. Podemos considerar a importância desta molécula em diversas patologias como: doenças pulmonares (Reis e cols., 2004), afecções gastrointestinais (Kountouras e cols., 2005), na imunologia de tumores (Igney e Krammer,

2005; Wajant e cols., 2005), em doenças linfoproliferativas (Oliveira e Fleisher, 2004) e outras.

4.1. *Fas-L e miocardite aguda:*

Ishiyama e cols. (1997) descreveram que o excesso de óxido nítrico produzido pela óxido nítrico sintetase (NOS) contribui para a progressão da lesão do miocárdio na miocardite. Contudo, o mecanismo molecular da lesão no miocárdio e a morte das células na miocardite não foram detalhados. Em 1998, este mesmo grupo sugeriu que a via de morte celular por apoptose de cardiomiócitos e linfócitos é mediada pela interação Fas/Fas-L na lesão por miocardite autoimune (Ishiyama e cols., 1998).

Huber e cols. em 1999, iniciaram uma série de publicações utilizando o modelo murino de miocardite aguda induzida pela infecção pelo vírus *Coxsackie* do tipo B (CVB) e descreveram que a infecção por este vírus estimula a resposta autoimune de células T a antígenos cardíacos. Mostraram que a indução da patogenia depende de células T CD4⁺ Th1 (IFN- γ), enquanto que as respostas com perfil de células T Th2 (IL-4⁺) estariam associadas a um perfil mais resistente à infecção. A modulação entre qual tipo de resposta seria prevalente requer a interação direta célula-célula e é mediada por atividade citotóxica dependente de Fas/Fas-L. O grupo aprofunda suas pesquisas (Huber e cols., 2000) e propõe que células T γ/σ cardíacas possuem elevados níveis de Fas-L na sua superfície, promovendo a lise de células T CD4⁺ Th2 específicas para o vírus. Desta maneira, com a lise desta população, haveria o predomínio da população de células T CD4⁺ Th1, responsáveis pela gravidade da miocardite. Na mesma época, outro grupo de pesquisa, utilizando o modelo murino infectado pelo CVB, demonstrou que animais deficientes na expressão de Fas (*lpr*), Fas-L (*gld*) e camundongos tratados com anticorpos monoclonais (mAb) anti-Fas-L tinham uma diminuição da inflamação no miocárdio (Seko e cols., 2002). Também ocorreu a diminuição de expressão do IFN- γ , IL-2 e iNOs no tecido cardíaco. Esses resultados sugeriram então que a via Fas/Fas-L exerce um papel importante na regulação da miocardite e ativação celular, pelo menos, neste modelo de miocardite viral (Seko e cols., 2002). Este autor em 2006 relacionou a ação da angiotensina II (Ang II) e os efeitos de bloqueadores de receptores para Ang II (BRA) que são utilizados no tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e fibrose do miocárdio na miocardite

aguda induzida pelo CVB. O mesmo pesquisador utilizou o olmesartan, um novo BRA, e observou uma diminuição significativa da expressão de IFN- γ , Fas-L, e iNOS no tecido cardíaco, indicando que o tratamento suprimiu a ativação de linfócitos e infiltração inflamatória. Este BRA também diminuiu a carga viral e os níveis de 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxiguanosina), um biomarcador plasmático de danos oxidativos induzidos no DNA no tecido cardíaco (Seko, 2006).

Outros trabalhos correlacionaram a co-expressão de Fas e Fas-L na infiltração de leucócitos do tecido cardíaco com hipertrofia e insuficiência cardíaca. Um deles sugeriu que a molécula Fas-L resultante da infiltração de células mononucleares ativadas pela quimiocina *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) causa a morte de miócitos, promovendo a falência cardíaca (Niu e cols., 2006). A elevação dos níveis plasmáticos de Fas e Fas-L solúveis podem ser um bom marcador sorológico para se determinar precocemente à gravidade da miocardite aguda e elaborar um prognóstico nos pacientes (Fuse e cols., 2000).

4.2. Fas-L e a infecção pelo *T. cruzi*:

A relação entre a interação Fas/Fas-L e a infecção pelo *T. cruzi* não foi muito estudada e isto fica mais evidente quando avaliamos a importância da molécula Fas-L durante o desenvolvimento da miocardite chagásica aguda. Não encontramos nenhuma publicação que correlacione a molécula Fas-L com a regulação inflamatória na evolução da miocardite aguda promovida pela infecção por *T. cruzi* em camundongos.

Demonstramos em nosso laboratório (Lopes e cols., 1999) que a ausência da molécula Fas-L aumentava a susceptibilidade de camundongos infectados por *T. cruzi* devido a uma resposta imune do tipo Th2. Naquele ano foi sugerido que o IFN- γ modulava a indução de apoptose de esplenócitos de camundongos infectados por dois mecanismos distintos: indução da produção de óxido nítrico (Martins e cols., 1999) e a expressão de Fas/Fas-L (Lopes e cols., 1999). Assim, sugere-se a importância de Fas/FasL na modulação da resistência à infecção experimental por *T. cruzi*. Utilizando camundongos *gld/gld*, Martins e colaboradores mostraram que além da diminuição na apoptose, a ausência da

molécula Fas-L também promoveu uma diminuição na produção de NO e aumento da produção de citocinas do tipo Th2. Estes autores propuseram, portanto, que a interação entre Fas/Fas-L também possui função de modulação da resposta imune (Martins e cols., 2001). Zuniga e cols. em 2002 sugeriram a possibilidade de bloquear a interação Fas/Fas-L em células B de ratos infectados pelo *T. cruzi* como meio de intensificar a resposta imune humoral antiparasitária, sem interferir no mecanismo de tolerância do hospedeiro.

Outra abordagem da função da molécula Fas-L na infecção pelo *T. cruzi* foi avaliada através da regulação de proliferação celular em órgãos imunes primários e secundários. Na fase aguda da infecção ocorre atrofia do timo determinada pela perda maciça de células T CD4+/CD8+ imaturas. Também em nosso laboratório foi avaliada a participação da via Fas/Fas-L e ficou demonstrado que esta interação não participa diretamente da atrofia tímica, seja induzindo morte celular seja como molécula co-estimulatória (Henriques-Pons, e cols. 2004). Contudo, em órgãos linfóides secundários, como no caso de linfonodos mesentéricos, a infecção pelo *T. cruzi* promove atrofia severa devido à intensa apoptose mediada pela interação Fas/Fas-L, neste caso por indução de morte de células T CD4+ (De Meis, e cols., 2006).

Pouco se sabe sobre a influência desta interação no mecanismo da regulação inflamatória no tecido cardíaco infectado pelo *T. cruzi*. A partir disto, torna-se relevante o entendimento de dois pontos que se interligam fisiologicamente em uma rede de *causa e consequência*. Precisamos entender qual é a função da interação entre Fas/Fas-L no mecanismo de regulação da infiltração inflamatória durante a miocardite aguda promovida pelo *T. cruzi*. Conseqüentemente, buscar o entendimento de como a regulação inflamatória terá influência no surgimento e na progressão da insuficiência cardíaca.

5. Insuficiência cardíaca – Características gerais:

A insuficiência cardíaca é uma condição grave na qual a quantidade de sangue bombeada pelo coração a cada minuto é insuficiente para suprir as demandas normais de

oxigênio e de nutrientes do organismo. Qualquer doença que afete o coração e interfira na circulação pode levar à insuficiência cardíaca. Sem dúvida, a mais comum dessas doenças é as doenças arteriais coronarianas, que limita o fluxo sanguíneo ao miocárdio e pode levar ao infarto do miocárdio. Outras doenças afetam principalmente o sistema de condução elétrica do coração, resultando em frequência de batimentos cardíacos lentos, rápidos ou irregulares, prejudicando o bombeamento do sangue pelo coração. A princípio, esse aumento produz contrações mais fortes, porém, mais tarde, o coração aumentado de tamanho pode diminuir sua capacidade de bombeamento e tornar-se insuficiente (Braunwald, 1992).

O organismo possui vários mecanismos de resposta para compensar a insuficiência cardíaca, tais como a resposta de emergência inicial (minutos ou horas), que é a reação de “luta ou fuga” causada pela liberação de adrenalina (epinefrina) e de noradrenalina (norepinefrina) pelas glândulas adrenais na corrente sanguínea. Desta forma, o coração trabalha mais vigorosamente, ajudando a aumentar o débito sanguíneo e, até certo ponto, compensando o problema de bombeamento (Guyton e Hall, 1997). Outro mecanismo corretivo consiste na retenção de sal pelos rins mantendo constante a concentração de sódio no sangue. Assim o organismo retém mais água aumentando o volume sanguíneo circulante e, a princípio, melhora o desempenho cardíaco. Uma das principais consequências da retenção de líquido é que o maior volume sanguíneo promove a distensão do miocárdio. O outro mecanismo de compensação importante do coração é o aumento da espessura do miocárdio (hipertrofia). O miocárdio hipertrofiado pode contrair com mais força, mas acaba funcionando mal e agrava a insuficiência cardíaca. Os pacientes com insuficiência cardíaca descompensada, ou seja, nos quais os mecanismos acima citados não conseguem mais equilibrar as funções cardíacas, apresentam cansaço e fraqueza (Guyton e Hall, 1997). O débito cardíaco pode retornar ao normal, embora, geralmente, às custas de um aumento da frequência cardíaca e de um batimento cardíaco mais forte. Por outro lado, no indivíduo sem cardiopatia que necessite de um aumento momentâneo da função cardíaca, essas respostas são benéficas (Nelson e Couto, 1992).

5. 1. A miocardite aguda e a insuficiência cardíaca:

A miocardite aguda está associada a uma disfunção ventricular esquerda aguda, gerada por infiltração celular inflamatória no miocárdio e aumento significativo da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Dentre estas, TNF- α e IL-1 β contribuem para a depressão da função do ventrículo esquerdo e para a perda de cardiomiócitos por apoptose (Torre-Amione e cols., 1996). A citocina TNF- α promove também hipertrofia e fibrose (Sivasubramanian, e cols., 2001), aumento da apoptose de miócitos e a ativação da iNOS (Von Haehling e cols. 2004). A IL-1 também possui a capacidade de deprimir a contração do miocárdio de forma dose dependente e contribuir para a apoptose de miócitos e hipertrofia. Além disso, associado a IL- β , o TNF- α mantém uma miocardite persistente em camundongos BALB/c desafiados com CVB3 (Lane e cols., 1993). Desta forma, a ativação neuro-humoral e a elevação do estresse oxidativo durante a disfunção ventricular esquerda na insuficiência cardíaca congestiva pode ser disparada por citocinas pró-inflamatórias. O aumento de radicais livres oxidativos está relacionado à ativação de p38-MAP-kinase e fator nuclear kappa B (NF κ B). Influindo diretamente na disfunção ventricular e no efeito ionotrópico negativo através da redução do influxo de cálcio no retículo sarcoplasmático (Barnes e cols., 1997). O aumento das citocinas está associado ainda ao desbalanço de metaloproteinases de matriz (MMPs) e o sistema de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) (Li e cols., 2002).

A persistência da reação inflamatória inicia um processo de remodelamento do miocárdio e desenvolvimento de cardiopatia dilatada, normalmente regulada pela: 1) Função de fibroblastos em expressar colágeno do tipo I e III e fibronectina; 2) regular o sistema de degradação de matriz pela expressão de MMPs e TIMPs e 3) secreção de ativadores de plasminogênio do tipo uroquinase e tecidual (Swik e cols., 2000; Nagase, 1997). Isto indica que o remodelamento do ventrículo esquerdo e a sua disfunção são altamente regulados por uma interação entre células residentes e não residentes no tecido cardíaco que migram em resposta à liberação de mediadores inflamatórios e componentes do sistema de degradação de matriz (Rutschow e cols., 2006).

Além das citocinas citadas, a IL-6 está elevada nas diferentes modalidades de insuficiência cardíaca aguda, como o infarto do miocárdio ou mesmo na miocardite aguda com insuficiência cardíaca congestiva (Torre-Amione e cols., 1996; Ridker e cols., 2000). Outro importante processo fisiológico no desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva é o envolvimento do sistema nervoso simpático através da elevação dos níveis de catecolaminas. Murray e cols., 2000, demonstraram que o estímulo crônico de receptores β -adrenérgicos promove um aumento na expressão de genes no miocárdio para a produção, mais uma vez das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. O tratamento da miocardite aguda com bloqueadores β -adrenérgicos promove redução da resposta inflamatória e remodelamento da matriz extracelular, diminuindo a disfunção ventricular esquerda (Pauschinger e cols., 2005). Esse remodelamento através da síntese de colágeno por fibroblastos cardíacos é regulado por múltiplos fatores, incluindo citocinas pró inflamatórias como TNF- α , IL-1 β ou TGF- β . As duas primeiras demonstraram diminuição da expressão de pró-colágeno do tipo I e III e aumento na expressão de fibronectina e pro-colágeno do tipo IV. Além disso, vários estudos mostram que fatores como aldosterona, TGF- β ou estresse mecânico induzem a síntese de colágeno (Siwik e cols., 2000). O sistema renina-angiotensina também participa na regulação da síntese de colágeno, pois a ANG II induz síntese e acúmulo de proteínas de matriz extracelular através da interação com o receptor AT1 mediado por TGF- β 1 e endotelina-1 (Fakhouri e cols., 2001). O infarto do miocárdio experimental em ratos demonstrou que a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) preveniu o acúmulo de colágeno, que foi completamente inibida por antagonistas do receptor AT1 (Smits e cols., 1992).

5.2. Insuficiência cardíaca e falência renal:

Nos Estados Unidos estima-se que aproximadamente seis milhões de americanos possuam combinações de doenças cardiovasculares (DCV) e doenças renais (DR) (Kalra e cols., 2005). No entanto, pacientes com insuficiência renal crônica possuem um risco acentuado de desenvolver infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, arritmias atriais e ventriculares e falência cardíaca (Herzog, 1999). Frequentemente, a doença renal co-existe com a falência cardíaca, chamada de *síndrome cardiorenal*, apresentando sintomatologia clínica de grande diversidade (Dries e cols., 2000; Silverberg

e cols., 2003). Entretanto, atualmente há evidências que sugerem que tanto o coração como o rim podem ser alvos de linhas de terapias comuns, especialmente com antagonistas do sistema renina angiotensina, reduzindo a progressão da doença cardíaca e prevenindo o dano renal (Kalra e cols., 2005).

Uma variedade de proteínas incluindo a ANG II, endotelinas, espécies oxigênio reativas (ROS), adrenalina, TNF e outras, tem sido envolvida de alguma maneira como potencialmente ativas e com propriedades bioquímicas suficientes para contribuir na progressão e falência de rim e coração. A aldosterona também está envolvida nesta progressão, por ser um mediador determinante de insuficiência renal crônica e doença cardíaca (Duprez e cols., 2000). Quando a doença inicial é renal, as razões possíveis para uma associação incluem o aumento renal-dependente na pressão arterial, a ativação do sistema renina angiotensina, o aumento na produção de outras substâncias vasoativas de origem renal. Além disso, os desequilíbrios eletrolíticos conduzem a arritmias normalmente fatais (Zanchetti e Stella, 1999).

Pacientes humanos com insuficiência renal crônica, paralelamente, apresentam também anemia e insuficiência cardíaca congestiva. Esta tríade de anemia, insuficiência renal e insuficiência cardíaca congestiva é denominada como *síndrome cardio anêmica renal* (Silverberg e cols., 2003). As três circunstâncias dão forma a um círculo vicioso, em que cada ponto é capaz de causar ou é causado por outro. A anemia pode aumentar a severidade da insuficiência cardíaca congestiva, estando associada a um aumento na mortalidade dos pacientes e na hospitalização. A anemia também pode prejudicar mais ainda a função renal e causar a necessidade de se realizar mais rapidamente a diálise do que nos pacientes que não apresentam o estado anêmico. Contudo, a própria insuficiência renal pode causar a anemia e desta maneira aumentar a severidade da insuficiência cardíaca pela menor produção de eritropoetina (Silverberg e cols., 2003).

Desta maneira podemos observar que a falência cardíaca e a falência renal estão associadas em diversos casos, tanto de forma aguda quanto crônica e a fisiopatologia das insuficiências cardíaca e renal deve ser analisada juntamente como causa eventual de morte.

5. 3. Falência renal e Fas-L:

A maioria dos trabalhos relacionando a ligação Fas/Fas-L e falência renal abordam a questão dos mecanismos apoptóticos na patogênese da insuficiência renal, principalmente no perfil crônico. Schelling e Cleveland (1999) descreveram que a atrofia tubular renal é um importante marcador da progressão da doença renal, indicando um prognóstico desfavorável em pacientes com falência renal. Todavia os mecanismos que regulam a atrofia glomerular não são completamente esclarecidos. A teoria mais aceita é a de que as células epiteliais dos túbulos renais estão sujeitas à isquemia crônica (Bohle e cols., 1996). Porém, a lesão isquêmica promove intensa necrose, situação que não é observada nas células epiteliais dos túbulos renais na maioria dos casos de doença renal crônica. Então, a atrofia tubular poderia estar ocorrendo através de apoptose, através da ligação entre a Fas/Fas-L, como proposto (Schelling e Cleveland, 1999).

Lorz e cols. (2000) observaram que as células epiteliais tubulares de camundongos eram os principais pontos para a localização de Fas-L no rim sem alteração patológica, provavelmente regulando a homeostase. Contudo, durante a doença renal ocorre a apresentação de Fas-L em outras localizações como células mesangiais, glomérulo e espaço intersticial com infiltração de leucócitos. No entanto, a presença de Fas-L no rim é um potencial regulador da resposta imune, promovendo a morte de células do parênquima e/ou limitando o influxo de células inflamatórias, bem como a apoptose em leucócitos e fibroblastos renais (Ortiz e cols. 2000). Em 2001, um estudo sobre a regulação de apoptose em neutrófilos durante a falência renal crônica mostrou que em pacientes com uremia avançada havia aumento de neutrófilos associados a moléculas de Fas e Fas-L (Jaber e cols., 2001). Também foi observado nos estágios finais de falência renal por nefroesclerose hipertensiva em ratos que ocorre um aumento na apoptose de células tubulares renais mediada por Fas-L (Sanders e Wang, 2002). Outros trabalhos relacionam a apoptose renal mediada pela molécula Fas-L em diversas condições como: ventilação mecânica (Imai e cols., 2003), síndrome de estresse respiratório (Kuo, 2003), hemodiálise (Wu e cols., 2005) e transplante renal (Cappellessio e cols., 2004). Miyazawa e colaboradores em 2002 observaram que células T também estão envolvidas na resposta imune inicial da lesão isquêmica, juntamente com os neutrófilos. Os autores propuseram que a citotoxicidade,

mediada possivelmente por Fas-L em neutrófilos e células T, pode ser um importante integrante no desenvolvimento da falência múltipla de órgãos seguida de falência renal aguda isquêmica. É relevante afirmar também que ocorre um aumento da susceptibilidade da falência renal aguda em casos de sepsis, mesmo não havendo hipotensão. Também foi observado que espécies reativas de oxigênio possuem função primordial na patogênese da morte das células tubulares renais através da ativação de Fas/Fas-L e que o tratamento com antioxidantes inibe o aumento da expressão de mRNA de Fas, Fas-L, e TNF- α , diminuindo a gravidade das lesões promovidas por agentes nefrotóxicos (Tsuruya e cols., 2003).

5.4. Falência renal e doença de Chagas:

Apesar de alguns autores descreverem uma forma disseminada da doença de Chagas durante a fase aguda da doença a presença de parasito nos tecidos é predominantemente associada ao músculo cardíaco, musculatura lisa e esquelética, e também ao sistema nervoso. O acometimento renal advindo da infecção pelo *T. cruzi* é pouco abordado na literatura, sem que haja inclusive um esclarecimento sobre a infecção do parasito no tecido renal. A maioria dos trabalhos que relaciona o rim e a doença de Chagas aborda a questão do transplante de órgãos. Pela primeira vez em 1997, Carvalho e cols. descreveram ninhos de amastigotas no parênquima renal em um paciente receptor de transplante renal um mês após a realização da cirurgia. O doador era de área endêmica da doença. Desta maneira, estes autores demonstraram que o *T. cruzi* possui a capacidade de infectar o parênquima renal e, no caso de pacientes imunossuprimidos, reativar a doença. Um levantamento realizado durante sete anos demonstrou que 17,2% dos pacientes submetidos ao transplante renal em um hospital na Argentina apresentaram a doença de Chagas após o transplante (Riarte e cols., 1999). O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos em 2001 também relatou a ocorrência de três casos de transmissão do *T. cruzi* através de transplantes de órgãos (CDC, 2002). Recentemente na Colômbia foi relatado um caso clínico de um paciente que apresentou elevação progressiva dos níveis séricos de creatinina após receber o transplante renal. Na análise histológica foi observada infiltração mononuclear, fibrose intersticial e atrofia tubular e a investigação do parênquima renal mostrou ninhos de amastigotas. Acredita-se que a transmissão do parasito tenha ocorrido através de transfusão

de sangue, pois tanto ele (receptor) quanto o doador não apresentavam anteriormente reatividade sorológica ao parasito (Arias e cols., 2006). Em 2004, Pinto e colaboradores, sugeriram uma patogenicidade previamente desconhecida do *T. cruzi* em uma microepidemia na Amazônia. Estes autores descreveram três casos de pacientes que apresentaram grave miocardite, falência renal e tamponamento cardíaco, evoluindo rapidamente para falência cardíaca apesar do tratamento com benznidazol. Desta maneira, interligam-se em diversas patologias, a deflagração da resposta inflamatória e a interação entre Fas/Fas-L regulando esta resposta e modulando a gravidade da miocardite, bem como correlacionando o comprometimento do sistema de condução elétrica e a função contrátil do músculo cardíaco, que leva à insuficiência cardíaca, falência e morte de pacientes. Além disso, a patologia cardíaca está intimamente associada a distúrbios na função renal e hematopoética. Desta forma é necessário o estudo da chamada síndrome cardio/anêmica/renal no contexto da infecção pelo *T. cruzi*, objetivo dessa tese.

6. Objetivos:

Os objetivos basearam-se na avaliação do envolvimento da via de toxicidade mediada pela interação entre Fas/Fas-L durante a o desenvolvimento da miocardite aguda.

- Avaliar os parâmetros parasitológicos dos camundongos deficientes na expressão da molécula Fas-L, como cinética de parasitemia e mortalidade.
- Investigar o desenvolvimento da miocardite através de marcadores sérico como CK-MB e a coleta do coração para avaliação histopatológica e por imunohistoquímica;

- Avaliar o fenótipo de células inflamatórias cardíacas por citometria de fluxo e estudar o perfil de expressão de marcadores de ativação, moléculas de adesão celular e co-receptores em camundongos deficientes em Fas-L.
- Avaliar por citometria de fluxo, a produção de citocinas por células inflamatórias cardíacas e também a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) por cardiomiócitos.
- Avaliar o desenvolvimento da miocardite aguda nos diferentes modelos murinos por meio de um conjunto de parâmetros clínicos e laboratoriais não invasivos, como métodos bioquímicos, ergometria, hematologia, eletrocardiografia e avaliação cardiovascular e parâmetros hemodinâmicos.
- Avaliar o comprometimento de outros órgãos vitais como fígado e rins também através de parâmetros clínicos e laboratoriais não invasivos, assim como avaliar a condição hematológica dos animais por métodos laboratoriais;
- Avaliar o envolvimento renal durante a infecção pelo *T. cruzi* através da histopatologia, além de avaliar a função da molécula Fas-L no comprometimento renal, tentando relacionar com a mortalidade dos animais.

A molécula Fas-L é membro da família dos receptores de TNF e possui função importante na regulação de processos apoptóticos, incluindo morte celular induzida por ativação (AICD), citotoxicidade mediada por células T e doenças autoimunes. Inclusive, o sistema Fas/Fas-L também tem sido relacionado à insuficiência hepática e disfunção cardíaca. (Wajant e cols, 2003).

Resumidamente, a morte celular induzida pela molécula Fas-L ocorre a partir da ligação com moléculas de Fas, formando um trímero acoplado ao complexo de sinalização chamado DISC (*death-inducing signaling complex*). Em seguida, há a chegada da FADD e a ativação de caspases 8 e 10 com atividade proteolítica (Chinnalyan e cols., 1995, Muzio e cols., 1998). A morte celular apoptótica extrínseca inicia-se por duas vias básicas: 1) a ativação de outras caspases, como a caspase-3, pela atividade enzimática da caspase-8, assim como 2) a clivagem da Bid gerando o fragmento tBid. Esta proteína transloca-se para a mitocôndria e induz a liberação de fatores pró-apoptóticos como citocromo c e Smac/Diablo por mecanismos dependentes de Bax/Bak (Wei, e cols 2001).

Um dos importantes pontos de participação da molécula Fas-L é nos tecidos considerados imunologicamente especializados. Nestes locais ocorre a inibição da propagação da reação inflamatória preservando a integridade e a função do órgão. Há aproximadamente dez anos atrás, foi observado que a molécula Fas-L era constitutivamente expressa na retina e envolvida diretamente no mecanismo de preservação do tecido diante de reações inflamatórias por induzir apoptose de células inflamatórias na barreira hemato-encefálica (Ferguson e Griffith, 2006). Em situação inversa, a ausência de Fas-L permite a exacerbação da lesão no tecido ocular durante a resposta imune (Griffith e cols, 1995).

A molécula Fas-L atua também regulando a produção de citocinas reguladoras, incluindo o TGF- β , que também é um importante co-fator na proteção dos tecidos imunologicamente especializados (Chen e cols, 1998). Por outro lado, a ligação entre Fas e Fas-L pode induzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias incluindo IL-6, MCP-1 e IL-8 em diversos tipos celulares como astrócitos, fibroblastos, células epiteliais de brônquios e células da musculatura lisa dos vasos (Choi e Beneviste, 2004). Desta maneira, podemos observar que a molécula Fas-L também atua na regulação inflamatória, participando até de processos de diferenciação e proliferação celular. Em 1993, foi descrito que a ativação da molécula Fas aumentava a proliferação de células T estimuladas pelo TCR (Alderson e cols, 1993). Além disso, foi observado que Fas-L pode induzir a ativação de ERK1/2, que está relacionada à proliferação celular também em fibroblastos (Ahn, e cols, 2001). Possivelmente, esta função ambígua é definida pelo microambiente celular, atuando por diferentes combinações de estímulos externos em vias de transdução de sinal intracelulares distintas que, conseqüentemente, geram respostas diferentes (Dockrell e cols., 2000).

Outra situação que podemos acrescentar é que, no caso de uma infecção intracelular e dependendo do microorganismo, pode ocorrer a inibição da expressão ou função apoptótica da molécula Fas, prolongando sua sobrevivência intracelular ao evitar a morte da célula hospedeira pelas células efectoras do sistema imune. (Dockrell, 2003).

O presente trabalho investigou a participação da interação Fas/Fas-L no curso da infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*. Esta abordagem surgiu em decorrência do estudo de vias citotóxicas majoritárias feito em nosso laboratório, como por exemplo, a via mediada pela perforina. Nós observamos que em camundongos infectados deficientes nesta molécula ocorria um aumento da intensidade da miocardite e da destruição de

cardiomiócitos, levando a uma maior mortalidade destes animais em relação ao seu controle, camundongos C57Bl/6 infectados (Henriques-Pons e cols 2002). Neste contexto, podemos deduzir que a perforina, além de ter importância nos mecanismos citotóxicos, possui influência direta na regulação do infiltrado inflamatório cardíaco após a infecção. Então, o outro passo em direção ao esclarecimento de mecanismos envolvidos na morte de cardiomiócitos e na patogenia da miocardite aguda, foi avaliar outra via citotóxica importante, a via mediada pela interação Fas/Fas-L, cuja descrição inicial também foi feita em nosso laboratório (Lopes e cols., 1999). Foi observado nestes animais *gld/gld* uma redução significativa da infiltração inflamatória cardíaca, com menor destruição de cardiomiócitos durante o curso da infecção aguda promovida pelo *T. cruzi*, ao contrário dos camundongos deficientes em perforina. Na ausência de Fas-L houve níveis equivalentes de células T CD4^{low} e CD8⁺, enquanto os camundongos Balb/c apresentaram predomínio de células CD8⁺ no infiltrado inflamatório cardíaco. Também observamos que na ausência de Fas-L os camundongos demonstravam aumento da expressão de interleucina-10, promovendo uma resposta imune do tipo mista Th1/Th2 e uma diminuição da expressão de molécula de adesão vascular do tipo 1 (VCAM) nas células do endotélio cardíaco. Observamos no infiltrado inflamatório de ambas as linhagens uma população de células com fenótipo CD3⁺CD4⁻/CD8⁻ chamada de linfócitos T duplo negativos. No entanto, nos camundongos *gld/gld* foi observada a diminuição da expressão de co-receptores e moléculas de adesão celular, como ICAM-1 e VCAM-1.

Células com fenótipo duplo negativo (DN) CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻ foram observadas e avaliadas quanto à regulação inflamatória em autoimunidade (Zangh e cols, 2001), rejeição a transplantes de órgãos (Chen e cols, 2005), em doenças infecciosas promovidas por patógenos intracelulares como a *Listeria monocytogenes* (Kadena e cols, 1997), *Francisella tularensis* LVS (Cowley e Elkins, 2003) e pelo protozoário *Leishmania* (Bottrel e cols., 2001). Porém, o estudo de células T DN em pacientes ou modelos animais infectados pelo *T. cruzi* é muito pouco descrito na literatura. Tarleton em 1991 descreveu em uma revisão sobre a infecção pelo *T. cruzi* que haveria a participação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e também a de células T DN no coração. Contudo, neste estudo não fica esclarecida a participação das células DN na patogenia e nos mecanismos da resposta imune frente à infecção. Aproximadamente 16 anos depois, Nagib e colaboradores em 2007 avaliaram

células T DN e observaram correlação positiva entre a presença destas células e o aumento dos níveis de IFN- γ no sangue periférico de ratos infectados. Os autores também sugerem que o aumento de células T DN e de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela cepa CL-Brener clone poderia estar envolvida com a gravidade e a rápida resolução da fase aguda tanto em ratos jovens como em adultos (Nagib e cols., 2007).

Uma pergunta torna-se relevante neste momento: Qual é a função da molécula Fas-L nestas células DN? O mecanismo exato através da qual a molécula Fas-L está envolvida na função e regulação da resposta imune envolvendo as células DN ainda não é possível descrever. No entanto, podemos sugerir que a molécula Fas-L apresenta função pró-inflamatória também nestas células DN, uma vez que camundongos *gld/gld* modularam negativamente as moléculas ICAM-1, CD2 e CD69 quando comparados aos Balb/c. A molécula Fas-L possuiria assim a função pró-inflamatória, na infecção, estimulando a ativação endotelial e o influxo de células inflamatórias para o tecido cardíaco. Essa regulação positiva pode estar relacionada à resposta imune do tipo Th1 e à expressão de citocinas como IFN- γ .

Outro ponto que nos chamou a atenção no decorrer deste estudo foi a menor lesão inflamatória nos animais *gld/gld*, o que nos levaria a crer que apresentariam maior sobrevida, quando comparados com a linhagem Balb/c. Entretanto, não foi o que aconteceu, pois os camundongos *gld/gld*, apesar de menor miocardite, apresentaram mortalidade ainda maior que os Balb/c. Assim como na miocardite induzida pela infecção, alguns estudos sugerem a influência da interação entre Fas/Fas-L na regulação da resposta inflamatória, como por exemplo, da miocardite induzida por *coksakievírus* em camundongos. Nesse modelo, células T $\gamma\delta$ modulam seletivamente a inibição da resposta imune Th2 pela indução de morte das células T CD4⁺ Th2 através da interação entre as moléculas Fas/Fas-L no coração (Huber e cols, 1999). Desta forma, há um enriquecimento em células Th1 patogênicas.

No caso da infecção pelo *T. cruzi*, estes dados são extremamente relevantes, pois poucos estudos abordam esta molécula durante o curso da infecção. Além disso, demonstramos que a ausência da molécula Fas-L aumentava a susceptibilidade de camundongos infectados por *T. cruzi* a partir da exacerbação de uma resposta imune do tipo Th2 (Lopes e cols., 1999, Guilherme e cols., 2007). Desta forma, é possível que também na

infecção por *T. cruzi* a interação Fas/Fas-L regule a apoptose e as respostas coordenadas de citocinas do tipo Th1 e Th2 por células T CD4 (Guilhermo e cols., 2007).

Embora na ausência de Fas-L os camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentem menor miocardite, a avaliação histopatológica do tecido hepático (dados não mostrados) e renal de animais *gld/gld* infectados demonstrou que nestas mesmas condições ocorria aumento da infiltração inflamatória, em comparação aos Balb/c, justamente o contrário do tecido cardíaco. Assim, nossa próxima abordagem foi investigar a causa de morte dos animais *gld/gld* pois aparentemente não somente o coração estaria envolvido na causa de morte dos animais na infecção, mas outros órgãos vitais poderiam também estar envolvidos de forma decisiva no óbito do animal na fase aguda.

Este é um dos pontos cruciais no estudo da infecção experimental. Por outro lado, na fase crônica, pode-se dizer que a morte do animal estaria geralmente relacionada à evolução da miocardiopatia dilatada. Nossa investigação não pretende questionar este ponto de observação. Contudo, a partir de nossos resultados, sugerimos que a relação direta entre a infecção pelo *T. cruzi* e a patologia cardíaca como causa de morte não é absoluta e única. Inclusive, outros resultados do nosso laboratório demonstram que a infecção pelo *T. cruzi*, possui uma importante influência em outros sistemas além do cardiovascular. Podemos observar, além das alterações cardiovasculares e renais, distúrbios no sistema digestivo.

A pergunta central neste ponto da discussão é: Por que os camundongos *gld/gld* apresentam menor miocardite aguda e mesmo assim, apresentam mortalidade integral dos animais infectados? Nossos resultados indicaram que o sistema cardio/renal está diretamente relacionado à evolução da insuficiência cardíaca durante o curso da infecção, não somente na linhagem *gld/gld*, mas também no seu controle Balb/c. Embora na ausência da molécula Fas-L as disfunções cardiovasculares sejam mais graves e mais precoces.

O surgimento e a progressão da insuficiência cardíaca em pacientes muitas vezes está interligado à insuficiência renal e ao estado anêmico. A abordagem terapêutica em relação à reversão da anemia e ao controle da insuficiência renal diminuiu o tempo de internação dos pacientes e aumentou a sua qualidade de vida (Silverberg e cols, 2003). Assim, foi descrita a síndrome cardio/anêmica/renal a qual é caracterizada por um círculo vicioso onde não se pode afirmar com certeza a alteração causadora e sua consequência. Podemos exemplificar pela insuficiência renal aguda desencadeando o estado anêmico e,

por conseguinte, a evolução da falência cardíaca. No entanto, também é possível que o surgimento da insuficiência cardíaca possa causar a insuficiência renal e ser agravada pela instalação da anemia (Silverberg e cols, 2003).

Através da descrição da literatura, observamos que o envolvimento renal em pacientes com doença de Chagas está restrito a casos de transplante de órgãos e ao uso de imunossupressores (Carvalho e cols, 1997 e Riarte e cols, 1999). Recentemente, Pinto e colaboradores em 2004 observaram na região amazônica pacientes com infecção pelo *T. cruzi* apresentando sintomas clínicos e laboratoriais condizentes com o quadro de insuficiência renal. Este estudo é o único que correlaciona a infecção por *T. cruzi* em pacientes com alterações renais e desta maneira não podemos ser conclusivos, pois o número de casos é reduzido. Todavia, este trabalho demonstra a possibilidade da presença de insuficiência renal em pacientes infectados pelo *T. cruzi*.

Em linhas gerais, com relação aos nossos dados na primeira semana de infecção em ambas linhagens, há um comprometimento da função de filtração renal, gerando um quadro clinicamente conhecido como disúria. Concomitantemente houve significativa queda dos valores da pressão arterial média (sistólica e diastólica) e elevação progressiva dos níveis séricos de uréia, creatinina, K⁺ e Na⁺. Através da avaliação histopatológica qualitativa do tecido renal, foi observada destruição discreta das células dos túbulos proximais renais, atrofia glomerular e ausência de ninhos de parasito pela microscopia óptica e através da ecocardiografia pudemos observar o início da insuficiência cardíaca. Na segunda semana há um aumento na pressão arterial, sugerindo a ativação de mecanismos compensatórios da hipotensão registrada, além de queda significativa de todos os quesitos estudados na avaliação hematológica (anemia hipocrômica). Entre o 15º e o 21º dpi observamos então o início da mortalidade dos animais na fase aguda, sendo um fator complicador para a análise. Os camundongos *gld/gld*, de forma geral apresentam todos os resultados descritos mais precocemente e com maior gravidade, além da maior infiltração inflamatória renal, o que pode estar relacionado à alta mortalidade desses animais. Por outro lado, animais *gld/gld* não infectados já possuem menor volume de urina e talvez este também seja um dos resultados que podemos relacionar a menor resistência à infecção pelo *T. cruzi*.

Podemos indicar que a ação do *T. cruzi*, pelo menos durante a fase aguda, não se restringe somente ao coração. A insuficiência cardíaca ocorre, portanto, por uma reação em

cadeia que envolve os sistemas cardiovascular, renal e hematológico em camundongos. Entretanto, não podemos definir exatamente através de quais mecanismos a molécula Fas-L está diretamente envolvida na complexa evolução da insuficiência cardíaca.

Nossa intenção é abordar o estudo do rim e do coração de forma interligada, pois como já se sabe, possuem estreita ligação com múltiplas conexões multifatoriais. Recentemente foi observado que a liberação de NO, a ativação nervosa simpática e a presença de inflamação sistêmica promovem alterações estruturais do ventrículo esquerdo e também alterações renais. Uma variedade de proteínas incluindo a ANG II, outras espécies reativas de oxigênio, adrenalina e TNF- α também estão envolvidas como potenciais moléculas biologicamente ativas relacionadas à progressão da patologia e na falência do coração e do rim. Recentemente um estudo sugeriu que a aldosterona também esteja envolvida como importante mediador no surgimento e na progressão da insuficiência cardíaca e renal (Duprez e cols, 2000). Além disso, através da mesma abordagem terapêutica de bloqueio do sistema renina-angiotensina é conseguida uma melhora na qualidade de vida do paciente ao atuar também no rim e coração (Kalra e cols, 2005). Em pacientes com comprometimento das funções renais podemos observar alterações no sistema de coagulação, fibrinólise, disfunção endotelial, freqüentemente anemia e desregulação no balanço entre sódio e potássio. Durante a insuficiência renal crônica geralmente ocorre interferência direta na função do cardiomiócito, alteração de matriz extracelular e remodelamento do ventrículo esquerdo relacionado à anemia e aumento na incidência de arritmias (Kalra e cols, 2005).

Também podemos encontrar a liberação de substâncias como a cicloxigenase – 2 (COX-2) e noradrenalina ocasionado disfunção endotelial e complicações vasculares. Logo, podemos também explicar o surgimento da falência renal e cardíaca, além da possibilidade de doenças coronárias (Kalra e cols, 2005).

A hipotensão observada nos animais do presente estudo pode estar relacionada à acidose metabólica, por exemplo. A acidose moderada pelo aumento de íons cloreto pode elevar os níveis da enzima iNOS promovendo vasodilatação e a queda na pressão arterial periférica. Este estado de acidose promove diminuição da fração de ejeção e diminui a perfusão renal, provavelmente pela diminuição da expressão de receptores adrenérgicos β 2. (Kellun e cols, 2004).

Pacientes acometidos com insuficiência renal aguda demonstram alta incidência de anemia (Hoste e Kellun, 2006), como dito anteriormente, e podemos observar nestes pacientes a diminuição na produção e na viabilidade de células vermelhas do sangue. No caso de pacientes acometidos com alguma infecção, ocorre diminuição da produção de eritropoetina e/ou resistência à ação da mesma, conseqüentemente diminuindo a síntese de eritrócitos pela medula óssea (Lipkin e cols, 1989). O tempo de vida das hemáceas também pode encontrar-se reduzido pelo aumento da fragilidade da membrana (Nagano e cols, 1990). Além disso, a trombopatia urêmica promovida pelo aumento dos níveis de uréia no plasma, interfere no mecanismo de coagulação e promove perda de sangue por pequenas hemorragias, às vezes imperceptíveis (Weigert e Schafer, 1998). Ressaltamos que em pacientes com doença coronária, a anemia promove severas conseqüências hemodinâmicas (Hoste e Kellun, 2006).

Em relação à ocorrência da insuficiência cardíaca os receptores para angiotensina do tipo II (ATII) intracardíacos encontram-se também na superfície de fibroblastos e estão envolvidos em respostas de curto ou longo prazo e ao estímulo da aldosterona no coração. Em ensaios *in vitro*, a ANG II aumenta a síntese de colágeno mediada por fibroblastos e há aumento da expressão de RNAm para colágeno do tipo I, tipo III, colágeno pró-alfa 1 e fibronectina (Lijnen e Petrov, 2003), além da inibição de metaloproteinase de matriz do tipo 1. Em ensaios *in vivo*, a infusão crônica de angiotensina II aumenta a fração de colágeno nos ventrículos. Terapias associadas com inibidores da enzima conversora de angiotensina em pacientes com insuficiência cardíaca sintomática com classificação de III a IV (NYHA – *New York Heart Association*) apresentam mortalidade reduzida em até 30% (Lijnen e Petrov, 2003). Além disso, também podemos acrescentar que o TGF- β induz a proliferação de fibroblastos cardíacos, deposição de matriz extracelular e proteínas como colágeno e proteoglicanos (Rosenkranz, 2004) podendo também ser mais um componente no remodelamento cardíaco.

Em pacientes infartados observa-se o rápido remodelamento ventricular por um complexo processo que é considerado um fator determinante da progressão da falência cardíaca congestiva (Guo e cols, 2005). As evidências estão mais uma vez direcionadas para a ativação do sistema renina angiotensina de forma ainda não completamente esclarecida. Contudo através do bloqueio da enzima conversora de angiotensina e

receptores para angiotensina II do tipo 1 (ATI) observa-se diminuição do remodelamento cardíaco e da disfunção ventricular (Guo e cols, 2005).

Nossos dados de análise histológica e dosagem de uréia mostram que há lesões tubulares renais precoces cujos mecanismos estão sendo estudados. Entretanto há diversas possibilidades a serem discutidas. Durante as décadas de 50 e 60 um pesquisador chamado Seneca H. publicou diversos estudos em relação a doenças que acometem o trato urinário e rins e seus possíveis tratamentos. A análise de sua produção científica mostra publicações relacionadas à infecção pelo *T. cruzi*. Em 1966, um estudo avaliava as propriedades imunobiológicas da substância denominada por ele de *chagastoxina*, inclusive sugerindo ser um lipopolissacarídeo (Seneca e Peer, 1966). No mesmo ano foi proposto por este pesquisador a imunização ativa de camundongos pela chagastoxina (Seneca e cols, 1966) e em 1969 ele descreveu a presença de toxemia experimental em camundongos devido à chagastoxina (Seneca, 1969). O último estudo catalogado por Seneca é datado em 1982 sobre a infecção por Clamídia e nenhum estudo deste autor de 1969 até 1982 relaciona a infecção pelo *T. cruzi* e a chagastoxina. Além disso, nenhum outro autor relaciona em seus estudos a presença, ou denomina como tal, a uma toxina do *T. cruzi*.

Uma outra possibilidade poderia ser a liberação da enzima *trans*-sialidase do parasito. Esta enzima é capaz de transferir unidades de ácido siálico de moléculas do hospedeiro para glicoproteínas aceptoras presentes na superfície do *T. cruzi* (semelhantes a mucinas) (Buscaglia e cols., 2006). Porém, foi demonstrado que a enzima pode se ancorar em tecidos do hospedeiro, como no timo, e mediar também morte celular (Mucci e cols., 2002). Não podemos afirmar que a lesão renal precocemente surgida após a infecção pelo *T. cruzi* seja resultado de desses mecanismos. Dentre os mecanismos imunológicos que predominam na lesão glomerular podemos destacar a deposição de complexos antígeno-anticorpo como o principal. Os complexos são depositados no subendotélio ou no mesângio e quando depositados causam lesão tanto por mediadores celulares quanto solúveis incluindo a liberação de citocinas e mediadores de células citotóxicas por monócitos, macrófagos, linfócitos e células NK. Além disso, há ativação de componentes do sistema complemento como o C5b e C9 causando lise e ativação celular e liberação de proteases, radicais livres derivados do oxigênio e metabólitos do ácido aracdônico ativando-os (Robbins e Cotran, 2002).

Temos que acrescentar a esta complexa rede de alterações a desidratação em pacientes com insuficiência renal. Niebauer e colaboradores demonstraram níveis elevados de endotoxina em pacientes desidratados com insuficiência cardíaca crônica e edema (Niebauer e cols, 1999). Além disso, estes pacientes com edema possuiriam maiores concentrações de citocinas e após o tratamento com diuréticos houve a diminuição da concentração de endotoxina, sugerindo que a desidratação e a falência cardíaca promovem um aumento significativo destes mediadores e possivelmente ativando e/ou agravando a resposta inflamatória (Schindler, 2004). A elevação da atividade simpática durante a insuficiência cardíaca pode também contribuir para o aumento dos níveis de citocinas pois a permanente estimulação de receptores β -adrenérgicos induzem expressão de IL-6 e TNF- α (Murray e cols, 2000).

Discutimos estes diversos pontos para podermos esquematizar nossas hipóteses. No estágio inicial da infecção pelo *T. cruzi*, em camundongos, ocorreria marcante alteração renal, a qual poderia ser induzida por toxinas, enzimas e/ou antígenos liberados pelo próprio parasita. A partir disto, ocorre resposta inflamatória renal com liberação de mediadores inflamatórios; fixação de complemento e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além do comprometimento da função renal e a liberação de mediadores inflamatórios; o parasita pode promover de maneira sistêmica a liberação de NO, que seria percebido pelo aparelho justaglomerular através da queda na pressão arterial. A progressão da infecção levaria à disúria e uremia, demonstrando o comprometimento da filtração glomerular e propiciando a permanência da resposta inflamatória. Desta maneira, temos a endotoxemia, que em conjunto com os mediadores inflamatórios iria realizar a ativação do sistema rápido de compensação da pressão arterial e a ativação do sistema renina angiotensina. Por sua vez, esta substância, atuaria diretamente no miocárdio, realizando o remodelamento cardíaco através da estimulação de fibroblastos e a deposição de colágeno. Outra substância que poderia estar envolvida na fibrose e no remodelamento cardíaco, tanto na fase crônica quanto na fase aguda, é o TGF- β (Waghabi e cols., 2002 e Araújo-Jorge e cols., 2002). Com a perda progressiva da capacidade de contração cardíaca e a queda na fração de ejeção, caracterizamos a presença da insuficiência cardíaca. Neste momento, acrescentamos a possível presença de desidratação, agravando a endotoxemia e conseqüentemente a insuficiência cardíaca e renal. Então, a síndrome cardio/renal é

completada pela redução na capacidade de produção de células vermelhas pela medula óssea e a perda do tempo de viabilidade destas células na circulação, promovendo o estado anêmico. A anemia diminuiria a perfusão do tecido cardíaco promovendo o sofrimento do miócito e também a diminuição da perfusão renal. Desta maneira, associada a endotoxemia, poderíamos caracterizar a falência cardíaca e renal como pelo menos parte da causa de morte dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

Não temos dados estatísticos, clínicos ou epidemiológicos da presença de insuficiência renal em pacientes na fase aguda ou crônica indeterminada da doença de Chagas. Seria muito útil se em indivíduos infectados em período indeterminado de áreas endêmicas pudesse ser avaliada a capacidade renal como parâmetro prognóstico para desenvolvimento de cardiopatia. O tratamento apropriado desta síndrome cardio/anêmica/renal diminuiria o tempo de internação e aumentaria a qualidade de vida dos pacientes e poderia reduzir a incidência de cardiop

1. Camundongos *gld/gld* infectados pelo *Trypanosoma cruzi* apresentam maior mortalidade que seus controles Balb/c;
2. A molécula Fas-L atua modulando direta ou indiretamente a resposta inflamatória celular nos tecidos infectados, e regulando-a positivamente em rins e fígado e negativamente no coração;
3. Há precocemente durante a infecção pelo *T. cruzi* uma redução da função renal murina que se apresenta agravada na ausência da molécula Fas-L;
4. Durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*, podemos observar a presença de estado anêmico em camundongos, o que irá promover ou agravar a insuficiência cardíaca.
6. A infecção pelo *T. cruzi* promove uma síndrome cardio/anêmica/renal durante a fase aguda em camundongos.

BIBLIOGRAFIA

AHN JH, PARK SM, CHO HS, LEE MS, YOON JB, VILCEK J, LEE TH. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem*. 2001 Dec 14;276(50):47100-6.

ALDERSON MR, ARMITAGE RJ, MARASKOVSKY E, TOUGH TW, ROUX E, SCHOOLEY K, RAMSDELL F, LYNCH DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2231-5.

ALIBERTI JC, MACHADO FS, SOUTO JT, CAMPANELLI AP, TEIXEIRA MM, GAZZINELLI RT, SILVA JS. Beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4819-26.

ALIBERTI JC, SOUTO JT, MARINO AP, LANNES-VIEIRA J, TEIXEIRA MM, FARBER J, GAZZINELLI RT, SILVA JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1433-40.

ANDRADE ZA, ANDRADE SG, CORREA R, SADIGURSKY M, FERRANS VJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol*. 1994 Jun;144(6):1403-11.

ANTAS PR, MEDRANO-MERCADO N, TORRICO F, UGARTE-FERNANDEZ R, GOMEZ F, CORREA OLIVEIRA R, CHAVES AC, ROMANHA AJ, ARAUJO-JORGE TC. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Aug;61(2):308-14.

ARAÚJO-JORGE TC, WAGHABI MC, HASSLOCHER-MORENO AM, XAVIER JS, HIGUSHI ML, KERAMIDAS M. Implication of transforming growth factor- β in Chagas disease myocardiopathy. *J. Infect. Dis.* 2002; 186:1823-8

ARAUJO-JORGE TC, BARBOSA HS, MEIRELLES MN. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87 Suppl 5:43-56.

ARIAS LF, DUQUE E, OCAMPO C, HENAO J, ZULUAGA G, VARELA G, CARVAJAL J, DUQUE J, ROBLEDO-VILLEGAS M, ARBELAEZ M. Detection of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in a kidney graft with acute dysfunction. *Transplant Proc.* 2006 Apr;38(3):885-7.

BARNES KV, CHENG G, DAWSON MM, MENICK DR. Cloning of cardiac, kidney, and brain promoters of the feline ncx1 gene. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11510-7.

BELLGRAU D, GOLD D, SELAWRY H, MOORE J, FRANZUSOFF A, DUKE RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature.* 1995 Oct 19;377(6550):630-2.

BOHLE A, MULLER GA, WEHRMANN M, MACKENSEN-HAEN S, XIAO JC. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int Suppl.* 1996 May;54:S2-9..

BORDA ES, STERIN-BORDA LJ, PASCUAL JO, GORELIK G, FELIX JC, VON KREUTER BF, SANTOS-BUCH CA. *Trypanosoma cruzi* attachment to lymphocyte muscarinic cholinergic and beta adrenergic receptors modulates intracellular signal transduction. *Mol Biochem Parasitol.* 1991 Jul;47(1):91-100

BOUCHARD VJ, ROULEAU M, POIRIER GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol.* 2003 Jun;31(6):446-54

BOTTREL, R.L., DUTRA, W.O., MARTINS, F.A., GONTIJO, B., CARVALHO, E., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., ALMEIDA, R.P., MAYRINK, W., LOCKSLEY, R., GOLLOB, K.J., 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 69, 3232–3239.

BRENER Z, GAZZINELLI RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997 Oct;114(2):103-10.

BREZIS M, ROSEN S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *N Engl J Med* 1995;332:647-55.

BRAUNWALD E. Heart disease: a text book of cardiovascular medicine . W. B. Saunders Company, Philadelphia. 4a Ed. 1992

BUSCAGLIA CA, CAMPO VA, FRASCH AC, DI NOIA JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Mar;4(3):229-36.

BUENDIA B, COURVALIN JC, COLLAS P. *Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis.* *Cell Mol Life Sci.* 2001 Nov;58(12-13):1781-9.

CAPPELLESSO S, VALENTIN JF, GIRAUDEAU B, BOULANGER MD, AL-NAJJAR A, BÄCHLER M, HALIMI JM, NIVET H, BARDOS P, LEBRANCHU Y, WATIER H. Association of donor TNFRSF6 (FAS) gene polymorphism with acute rejection in renal transplant patients: a case-control study. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Feb;19(2):439-43.

CAMPOS MA, GAZZINELLI RT. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *.Mediators Inflamm.* 2004 Jun;13(3):139-43.

CARVALHO MF, DE FRANCO MF, SOARES VA. Amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* detected in a renal allograft. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997 Jul-Aug;39(4):223-6.

CASTRO JA, DE MECCA MM, BARTEL LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006 Aug;25(8):471-9.

CATALINA MD, ESTESS P, SIEGELMAN MH. Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood*. 1999 Jan 15;93(2):580-9.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Chagas disease after organ transplantation--United States, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002 Mar 15;51(10):210-2.

CHEN, W., TORREALBA, J.R., WADDELL, T.K., GRANT, D., ZHANG, L. Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *Journal of Immunology* 2005 175, 3409–3416.

CHEN JJ, SUN Y, NABEL GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998;282:1714–1717.

CHINNALYAN AM, O'ROURKE K, TEWARI M, DIXIT VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995 81:505-512.

CHOI C, BENVENISTE EN. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004 Jan;44(1):65-81.

COUTINHO M, FREIRE JR, DIAS, JCP. The noble enigma: Chagas nominations for the Nobel price. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, sept 1999, vol 94 suppl 1 p. 123-129

COWLEY, S.C., ELKINS, K.L. Multiple T cells subsets control *Francisella tularensis* LVS intracellular growth without stimulation through macrophage interferon c receptors. *Journal of Experimental Medicine* 2003;198, 379–389.

DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.

DE MEIS J., MENDES-DA-CRUZ DA, FARIAS DE OLIVEIRA DA, CORREA-DE-SANTANA E, PINTO-MARIZ F, COTTA-DE-ALMEIDA V, BONOMO A, SAVINO W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. *Microbes Infect*. 2006; 8(1):221-31.

DEL MASCHIO A, ZANETTI A, CORADA M, RIVAL Y, RUCO L, LAMPUGNANI MG, DEJANA E. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol*. 1996 Oct;135(2):497-510.

DIAS, J.P. C. E COURA, J.R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico terapêutico. *Ed. Fiocruz*, 1997, 486p.

DRIES DL, EXNER DV, DOMANSKI MJ, GREENBERG B, STEVENSON LW. The prognostic implications of renal insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Mar 1;35(3):681-9

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE – DNDI, 2007 [Base de dados na internet]. Sítio: http://www.dndi.org.br/Portugues/doenca_chagas.aspx. [Acesso: março 2007]

DOCKRELL DH. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Aug;9(8):766-79.

DOS REIS GA, BORGES VM, ZIN WA. The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):285-93.

DUPREZ D, DE BUYZERE M, RIETZSCHEL ER, CLEMENT DL. Aldosterone and vascular damage. *Curr Hypertens Rep.* 2000 Jun;2(3):327-34.

FACULDADE DE MEDICINA – UNB – NOTÍCIAS ON LINE, 2005 [Base de dados na Internet]. Sítio: <http://www.unb.br/fm/noticias.htm> [Acesso: Março 2007]

FAKHOURI F, PLACIER S, ARDAILLOU R, DUSSAULE JC, CHATZIANTONIOU C. Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal cortex and aorta of transgenic mice through interaction with endothelin and TGF-beta. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Dec;12(12):2701-10.

FERGUSON TA, GRIFFITH TS. A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunol Rev.* 2006 Oct;213:228-38.

FUSE K, KODAMA M, OKURA Y, ITO M, HIRONO S, KATO K, HANAWA H, AIZAWA Y. Predictors of disease course in patients with acute myocarditis. *Circulation.* 2000 Dec 5;102(23):2829-35

GUYTON & HALL. Human physiology and mechanisms of disease. 1997. W. B. Saunders Company, Philadelphia. Ed. Guanabara Koogan S.A.

GERARD C, ROLLINS BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):108-15.

GRIFFITH TS, BRUNNER T, FLETCHER SM, GREEN DR, FERGUSON TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995 Nov 17;270(5239):1189-92

GUO W, JUNG WE, MARIONNEAU C, AIMOND F, XU H, YAMADA KA, SCHWARZ TL, DEMOLOMBE S, NERBONNE JM. Targeted deletion of Kv4.2 eliminates I(to,f) and results in electrical and molecular remodeling, with no evidence of ventricular hypertrophy or myocardial dysfunction. *Circ Res*. 2005 Dec 9;97(12):1342-50.

HAHNE M, RENNO T, SCHROETER M, IRMLER M, FRENCH L, BORNARD T, MACDONALD HR, TSCHOPP J. Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur J Immunol*. 1996 Mar;26(3):721-4.

HAUNSTETTER A, IZUMO S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998 Jun 15;82(11):1111-29.

HENRIQUES-PONS A, OLIVEIRA GM, PAIVA MM, CORREA AF, BATISTA MM, BISAGGIO RC, LIU CC, COTTA-DE-ALMEIDA V, COUTINHO CM, PERSECHINI PM, ARAUJO-JORGE TC. Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Pathol*. 2002 Apr;83(2):67-79.

HENRIQUES-PONS A, DEMEIS J, COTTA-DE-ALMEIDA V, SAVINO W, ARAUJO-JORGE TC. Fas and perforin are not required for thymus atrophy induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*. 2004 May-Jun;107(1-2):1-4.

HERZOG CA. Acute myocardial infarction in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl*. 1999 Jul;71:S130-3

HIGUSHI, M.L., BEVENUTTI, L.A., REIS, M.M., METZNGER, M. Pathophysiology of the heart in Chagas disease current status and new developments. *Cardiovascular research*. Vol 60, Issue 1, October 2003, pp. 96-107

HOFT DF, SCHNAPP AR, EICKHOFF CS, ROODMAN ST. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2000 Jan;68(1):197-204

HOSTE EA, KELLUM JA. Acute kidney dysfunction and the critically ill. *Minerva Anesthesiol*. 2006 Mar;72(3):133-43.

HUBER SA, BUDD RC, ROSSNER K, NEWELL MK. Apoptosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:181-90.

HUBER SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):579-87.

IGNEY FH, KRAMMER PH. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Nov;54(11):1127-36. Epub 2005 May 12.

IMAI Y, PARODO J, KAJIKAWA O, DE PERROT M, FISCHER S, EDWARDS V, CUTZ E, LIU M, KESHAVJEE S, MARTIN TR, MARSHALL JC, RANIERI VM, SLUTSKY AS. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA*. 2003 Apr 23-30;289(16):2104-12.

ISHIYAMA S, HIROE M, NISHIKAWA T, ABE S, SHIMOJO T, ITO H, OZASA S, YAMAKAWA K, MATSUZAKI M, MOHAMMED MU, NAKAZAWA H, KASAJIMA T, MARUMO F. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*. 1997 Jan 21;95(2):489-96.

JABER BL, PERIANAYAGAM MC, BALAKRISHNAN VS, KING AJ, PEREIRA BJ. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. *J Leukoc Biol.* 2001 Jun;69(6):1006-12.

JONES EM, COLLEY DG, TOSTES S, LOPES ER, VNENCAK-JONES CL, MCCURLEY TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Mar;48(3):348-57.

KADENA, T., MATSUZAKI, G., FUJISE, S., KISHIHARA, K., TAKIMOTO, H., SASAKI, M., BEPPU, M., NAKAMURA, S., NOMOTO, K. TCR $\alpha\gamma$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ T cells differentiate extrathymically in lck-independent manner and participate in early response against *Listeria monocytogenes* infection through interferon-gamma production. *Immunology* 1997 91, 511–519.

KALRA V, MAHAJAN S, AGARWAL SK, TIWARI SC. Cardiorenal disease: a clinical intersection. *Int Urol Nephrol.* 2005;37(1):175-84.

KELLUM JA, SONG M, VENKATARAMAN R. Effects of hyperchloremic acidosis on arterial pressure and circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. *Chest.* 2004 Jan;125(1):243-8.

KOUNTOURAS J, ZAVOS C, CHATZOPOULOS D. Apoptotic and anti-angiogenic strategies in liver and gastrointestinal malignancies. *J Surg Oncol.* 2005 Jun 15;90(4):249-59.

KUO YH. Apoptosis and renal function in patients with acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2003 Jul 23;290(4):461

LANE JR, NEUMANN DA, LAFOND-WALKER A, HERSKOWITZ A, ROSE NR. Role of IL-1 and tumor necrosis factor in coxsackie virus-induced autoimmune myocarditis. *J Immunol.* 1993 Aug 1;151(3):1682-90.

LANNES-VIEIRA J. Trypanosoma cruzi-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Apr;98(3):299-304. Epub 2003 Jul 18.

LAUCELLA S, DE TITTO EH, SEGURA EL, ORN A, ROTTENBERG ME. Soluble cell adhesion molecules in human Chagas' disease: association with disease severity and stage of infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Dec;55(6):629-34.

LAWRENCE MB, SPRINGER TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol.* 1993 Dec 1;151(11):6338-46.

LENT H. Evolution of the knowledge about Chagas disease vectors 90 years after its discovery *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:89-92.

LI J, HUYNH H, CHAN E. Evidence for dissolution rate-limited absorption of COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, leading to the irregular absorption profile in rats after oral administration. *Pharm Res.* 2002 Nov;19(11):1655-62

LIJNEN PJ, PETROV VV. Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003 Sep;25(7):541-64.

LIPKIN GW, KENDALL R, HAGGETT P, TURNEY JH, BROWNJOHN AM. Erythropoietin in acute renal failure. *Lancet.* 1989 May 6;1(8645):1029

LORZ C, ORTIZ A, JUSTO P, GONZALEZ-CUADRADO S, DUQUE N, GOMEZ-GUERRERO C, EGIDO J. Proapoptotic Fas ligand is expressed by normal kidney tubular epithelium and injured glomeruli. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Jul;11(7):1266-77.

LOPES MF, NUNES MP, HENRIQUES-PONS A, GIESE N, MORSE HC 3RD, DAVIDSON WF, ARAUJO-JORGE TC, DOSREIS GA. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur J Immunol.* 1999 Jan;29(1):81-9.

LUSTER AD, ALON R, VON ANDRIAN UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* 2005 Dec;6(12):1182-90.

MACHADO FS, MARTINS GA, ALIBERTI JC, MESTRINER FL, CUNHA FQ, SILVA JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000 Dec 12;102(24):3003-8.

MARINHO CR, D'IMPERIO LIMA MR, GRISOTTO MG, ALVAREZ JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun.* 1999 Jan;67(1):308-18.

MARTIN-PADURA I, LOSTAGLIO S, SCHNEEMANN M, WILLIAMS L, ROMANO M, FRUSCELLA P, PANZERI C, STOPPACCIARO A, RUCO L, VILLA A, SIMMONS D, DEJANA E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):117-27.

MARTIN D, TARLETON R. Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev.* 2004 Oct;201:304-17.

MARTIN DL, TARLETON RL. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2005 Feb 1;174(3):1594-601.

MARTINS GA, VIEIRA LQ, CUNHA FQ, SILVA JS. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):3864-71.

MARTINS GA, PETKOVA SB, MACHADO FS, KITSIS RN, WEISS LM, WITTNER M, TANOWITZ HB, SILVA JS. Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology*. 2001 May;103(1):122-9.

MALMUSI M, ACKERMAN AB. A critical review of apoptosis in historical perspective *Am J Dermatopathol*. 2000 Jun;22(3):291-3.

MEIRELLES MN, PEREIRA MC, SINGER RH, SOEIRO MN, GARZONI LR, SILVA DT, BARBOSA HS, ARAUJO-JORGE TC, MASUDA MO, CAPELLA MA, LOPES AG, VERMELHO AB. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: new contributions regarding a better understanding of this interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:149-52.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS *ON LINE*, 2007 [Base de dados na Internet]. Sítio: <http://www.msf.org.br/mhome.asp>. [Acesso: Março 2007].

MCEVER RP, CUMMINGS RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11 Suppl):S97-103.

MICHAILEWSKY V, SILVA NM, ROCHA CD, VIEIRA LQ, LANNES-VIEIRA J, GAZZINELLI RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling

tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001 Nov;159(5):1723-33

MINOPRIO PM, COUTINHO A, JOSKOWICZ M, D'IMPERIO LIMA MR, EISEN H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 1986 Dec;24(6):669-79

MIYAZAWA S, WATANABE H, MIYAJI C, HOTTA O, ABO T. Leukocyte accumulation and changes in extra-renal organs during renal ischemia reperfusion in mice. *J Lab Clin Med*. 2002 May;139(5):269-78

MIWA K, ASANO M, HORAI R, IWAKURA Y, NAGATA S, SUDA T. Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1287-92.

MONCAYO A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Jul;98(5):577-91.

MOORE FA, MOORE EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am* 1995;75: 257-77.

MUCCI J, HIDALGO A, MOCETTI E, ARGIBAY PF, LEGUIZAMON MS, CAMPETELLA O. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3896-901.

MURRAY DR, PRABHU SD, CHANDRASEKAR B. Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation*. 2000 May 23;101(20):2338-41

MUZIO M, STOCKWELL BR, STENNICKE HR, SALVESEN GS, DIXIT VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998 273:2926-2930.

NAGIB PR, DUTRA WO, CHIARI E, MACHADO CR. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3+CD4-CD8- T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp Parasitol.* 2007 Aug;116(4):366-74.

NAGASE H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151– 60.

NAGANO N, KOUMEGAWA J, ARAI H, WADA M, KUSAKA M. Effect of recombinant human erythropoietin on new anaemic model rats induced by gentamicin. *J Pharm Pharmacol.* 1990 Nov;42(11):758-62

NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1449-56.

NELSON, R.W. E COUTO, C.G. Essentials of small animal internal medicine. Mosby – Year Book Inc. 1992. p 32

NIEBAUER J, VOLK HD, KEMP M, DOMINGUEZ M, SCHUMANN RR, RAUCHHAUS M, POOLE-WILSON PA, COATS AJ, ANKER SD. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet.* 1999 May 29;353(9167):1838-42

NIEHANS GA, BRUNNER T, FRIZELLE SP, LISTON JC, SALERNO CT, KNAPP DJ, GREEN DR, KRATZKE RA. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res.* 1997 Mar 15;57(6):1007-12.

NIU J, AZFER A, DEUCHER MF, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ, OLATTUKUDY PE. Targeted cardiac expression of soluble Fas prevents the development of heart failure in mice with cardiac-specific expression of MCP-1. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Jun;40(6):810-20.

OLIVEIRA JB, FLEISHER T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004 Dec;4(6):497-503.

ORLINICK JR, VAISHNAW AK, ELKON KB. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol.* 1999;18(4):293-308.

ORTIZ A, LORZ C, CATALAN MP, DANOFF TM, YAMASAKI Y, EGIDO J, NEILSON EG. Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int.* 2000 Mar;57(3):969-81

PARADA H, CARRASCO HA, ANEZ N, FUENMAYOR C, INGLESSIS I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol.* 1997 Jun 27;60(1):49-54

PAUSCHINGER M, RUTSCHOW S, CHANDRASEKHARAN K, WESTERMANN D, WEITZ A, PETER SCHWIMBECK L. Carvedilol improves left ventricular function in murine *Coxsackievirus*-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1h and MMP-8 expression and a modulated immune response. *Eur J Heart Fail* 2005;7:444– 52.

PRATA A., Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infection Disease*, 2001 sep; 1(2): 92-100

PINTO AY, VALENTE SA, VALENTE VDA C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis.* 2004 Dec;8(6):454-60.

PUNUKOLLU G, GOWDA RM, KHAN IA, NAVARRO VS, VASAVADA BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 2007 Feb 14;115(3):279-83.

RIARTE A, LUNA C, SABATIELLO R, SINAGRA A, SCHIAVELLI R, DE RISSIO A, MAIOLO E, GARCIA MM, JACOB N, PATTIN M, LAURICELLA M, SEGURA EL, VAZQUEZ M. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clin Infect Dis.* 1999 Sep;29(3):561-7

RIBEIRO DOS SANTOS R, HUDSON L. *Trypanosoma cruzi*: Immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin Exp Immunol.* 1980 Apr;40(1):36-41.

ROBBINS & COTRAN . Fundamentos de patologia./Richard N. Mitcel... [et al] – Rio de Janeiro : Elsevier, 2006

ROSSI MA, BESTETTI RB. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology.* 1995;86(1):1-7.

ROSSI MA, RAMOS SG. *Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease.* Am Heart J. 1996 Jul;132(1 Pt 1):207-10.

ROSENKRANZ S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004 Aug 15;63(3):423-32.

ROOS A, XU W, CASTELLANO G, NAUTA AJ, GARRED P, DAHA MR, VAN KOOTEN C. *Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells.* Eur J Immunol. 2004 Apr;34(4):921-9.

ROTH SJ, CARR MW, ROSE SS, SPRINGER TA. Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *J Immunol Methods*. 1995 Dec 15;188(1):97-116.

RIDKER PM, RIFAI N, PFEFFER M, SACKS F, LEPAGE S, BRAUNWALD E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101: 2149–53.

RUTSCHOW S, LI J, SCHULTHEISS HP, PAUSCHINGER M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 15;69(3):646-56. Epub 2006 Jan 18.

SALLUSTO F, MACKAY CR, LANZAVECCHIA A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:593-620.

SANDERS PW, WANG PX. Activation of the Fas/Fas ligand pathway in hypertensive renal disease in Dahl/Rapp rats. *BMC Nephrol*. 2002 Jan 7;3:1.

SCHELLING JR, CLEVELAND RP. Involvement of Fas-dependent apoptosis in renal tubular epithelial cell deletion in chronic renal failure. *Kidney Int*. 1999 Oct;56(4):1313-6

SEKO Y, KAYAGAKI N, SEINO K, YAGITA H, OKUMURA K, NAGAI R. Role of Fas/FasL pathway in the activation of infiltrating cells in murine acute myocarditis caused by *Coxsackievirus* B3. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Apr 17;39(8):1399-403

SEKO Y. Effect of the angiotensin II receptor blocker olmesartan on the development of murine acute myocarditis caused by *coxsackievirus* B3. *Clin Sci (Lond)*. 2006 Mar;110(3):379-86.

SENECA H, PEER P. Immuno-biological properties of chagastoxin (lipopolysaccharide). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1966;60(5):610-20.

SENECA H, PEER P, HAMPAR B. Active immunization of mice with chagastoxin. *Nature*. 1966 Jan 15;209(5020):309-10.

SENECA H. Experimental toxæmia in mice due to chagastoxin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1969;63(4):535-9.

SCHINDLER R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Aug;19 Suppl 5:V34-40.

SHARMA K, WANG RX, ZHANG LY, YIN DL, LUO XY, SOLOMON JC, JIANG RF, MARKOS K, DAVIDSON W, SCOTT DW, SHI YF. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther*. 2000 Dec;88(3):333-47.

SILVA JS, MORRISSEY PJ, GRABSTEIN KH, MOHLER KM, ANDERSON D, REED SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*. 1992 Jan 1;175(1):169-74

SILVA JS, VESPA GN, CARDOSO MA, ALIBERTI JC, CUNHA FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun*. 1995 Dec;63(12):4862-7.

SILVA JS, MACHADO FS, MARTINS GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci*. 2003 May 1;8:s314-25.

SILVERBERG D, WEXLER D, BLUM M, WOLLMAN Y, IAINA A. The cardio-renal anaemia syndrome: does it exist? *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Nov;18 Suppl 8:viii7-12.

SILVERBERG DS, WEXLER D, BLUM M, SCHWARTZ D, WOLLMAN Y, IAINA A. Erythropoietin should be part of congestive heart failure management. *Kidney Int Suppl*. 2003 Nov;(87):S40-7.

SMITS JF, VAN KRIMPEN C, SCHOEMAKER RG, CLEUTJENS JP, DAEMEN MJ. Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20(5):772-8.

SILVA JS, FERRIOLI-FILHO F, KANESIRO MM, FERREIRA VF, SANTOS SC, PINTO CN, FONSECA JL, MIZRAHY HE, GILBERT B, PINTO MC. Evaluation of some organic compounds on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992 Jul-Sep;87(3):345-51.

SILVA ED, PEREIRA VR, GOMES JA, LORENA VM, CANCADO JR, FERREIRA AG, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, CORREA-OLIVEIRA R, GOMES YM. Use of the EIE-recombinant-Chagas-biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(3):132-6.

SIVASUBRAMANIAN N, COKER ML, KURRELMAYER KM, MACLELLAN WR, DEMAYO FJ, SPINALE FG, MANN DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation.* 2001 Aug 14;104(7):826-31

SIWIK DA, CHANG DL, COLUCCI WS. Interleukin-1 h and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts *in vitro*. *Circ Res* 2000;86:1259– 65.

STERIN-BORDA L, BORDA E. Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:273-80

STEEGMAIER M, BORGES E, BERGER J, SCHWARZ H, VESTWEBER D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci.* 1997 Mar;110 (Pt 6):687-94

STRAND S, HOFMANN WJ, HUG H, MULLER M, OTTO G, STRAND D, MARIANI SM, STREMMEL W, KRAMMER PH, GALLE PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med.* 1996 Dec;2(12):1361-6.

SOARES MB, SILVA-MOTA KN, LIMA RS, BELLINTANI MC, PONTES-DE-CARVALHO L, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am J Pathol.* 2001 Aug;159(2):703-9.

SOEIRO MDE N, PAIVA MM, BARBOSA HS, MEIRELLES MDE N, ARAUJO-JORGE TC. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. *Cell Struct Funct.* 1999 Jun;24(3):139-49

SZWARCWALD CL, CASTILHO EA. Estimated number of HIV infected individuals aged 15-49 years in Brazil, 1998. *Cad. Saúde Pública* 2000 vol.16 suppl 1

TALVANI A, RIBEIRO CS, ALIBERTI JC, MICHAILOWSKY V, SANTOS PV, MURTA SM, ROMANHA AJ, ALMEIDA IC, FARBER J, LANNES-VIEIRA J, SILVA JS, GAZZINELLI RT. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2000 Jul;2(8):851-66.

TARLETON RL Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* 1991 Jul;73(1):106-9.

TARLETON RL, GRUSBY MJ, ZHANG L. Increased susceptibility of Stat4- deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 2000 Aug 1;165(3):1520-5.

TANOWITZ HB, BURNS ER, SINHA AK, KAHN NN, MORRIS SA, FACTOR SM, HATCHER VB, BILEZIKIAN JP, BAUM SG, WITTNER M. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Sep;43(3):274-81

TANOWITZ HB, KIRCHHOFF LV, SIMON D, MORRIS SA, WEISS LM, WITTNER M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 1992 Oct;5(4):400-19.

TEIXEIRA AR, NASCIMENTO RJ, STURM NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Aug;101(5):463-91.

TORRE-AMIONE G, KAPADIA S, BENEDICT C, ORAL H, YOUNG JB, MANN DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunctions (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996; 27/5:1201– 6.

TORRE-AMIONE G, KAPADIA S, LEE J, DURAND JB, BIES RD, YOUNG JB, MANN DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996 Feb 15;93(4):704-11.

TSURUYA K, TOKUMOTO M, NINOMIYA T, HIRAKAWA M, MASUTANI K, TANIGUCHI M, FUKUDA K, KANAI H, HIRAKATA H, IIDA M. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Aug;285(2):F208-18.

UTGAARD JO, JAHNSEN FL, BAKKA A, BRANDTZAEG P, HARALDSEN G. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med.* 1998 Nov 2;188(9):1751-6.

VAGO AR, MACEDO AM, OLIVEIRA RP, ANDRADE LO, CHIARI E, GALVAO LM, REIS D, PEREIRA ME, SIMPSON AJ, TOSTES S, PENA SD. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol.* 1996 Dec;149(6):2153-9.

VILLALTA F, ZHANG Y, BIBB KE, KAPPES JC, LIMA MF. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun.* 1998 Oct;66(10):4690-5

VON HAEHLING S, OKONKO DO, ANKER SD. Statins: a treatment option for chronic heart failure? *Heart Fail Monit.* 2004;4(3):90-7

WAGHABI MC, COUTINHO CM, SOEIRO MN, PEREIRA MC, FEIGE JJ, KERAMIDAS M., Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor- β levels in mice deficient in alpha (2)-macroglobulin. *Infect. Immun.* 2002 70:5115-23

WAJANT H, GERSPACH J, PFIZENMAIER K. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Feb;16(1):55-76.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65.

WALSH K, SATA M. Negative regulation of inflammation by Fas ligand expression on the vascular endothelium. *Trends Cardiovasc Med.* 1999 Jan-Feb;9(1-2):34-41.

WEI Y, MCLENDON GL, HAMILTON AD, CASE MA, PURRING CB, LIN Q, PARK HS, LEE CS, YU T. Disruption of protein-protein interactions: design of a synthetic receptor that blocks the binding of cytochrome c to cytochrome c peroxidase. *Chem Commun (Camb).* 2001 Sep 7;(17):1580-1

WEIGERT AL, SCHAFER AI. Uremic bleeding: pathogenesis and therapy. *Am J Med Sci.* 1998 Aug;316(2):94-104.

WITKO-SARSAT V, RIEU P, DESCAMPS-LATSCHA B, LESAVRE P, HALBWACHS-MECARELLI L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000 May;80(5):617-53.

WU CC, LIAO TN, LU KC, CHEN JS, CHU P, LIN SH, CHUANG CH, LIN YF. Apoptotic markers on lymphocytes and monocytes are unchanged during single hemodialysis sessions using either regenerated cellulose or polysulfone membranes. *Clin Nephrol.* 2005 Sep;64(3):198-204

ZHANG ZX, YOUNG K, ZHANG L. CD3+CD4-CD8- $\alpha\beta$ -TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med.* 2001 Aug;79(8):419-27.

ZANCHETTI A, STELLA A. Cardiovascular disease and the kidney: an epidemiologic overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33 Suppl 1:S1-6; discussion S41-3..

ZUNIGA E, MOTRAN CC, MONTES CL, YAGITA H, GRUPPI A. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J Immunol.* 2002 Apr 15;168(8):3965-73.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)