

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS MAP QUINASES ERK 1 E 2 POR IMUNOISTOQUÍMICA

SALES, Tatyane Penha¹; **DAMASCENO**, Adilson Donizeti²; **MENEZES**, Liliana Borges³; **ARAÚJO**, Eugênio Gonçalves⁴

Palavras-chave: ERK 1/2, *Trypanosoma cruzi*, camundongo.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* na América Latina. Estudos que utilizaram imunoistoquímica e imunofluorescência demonstraram que a infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos determina um aumento da expressão da via de transdução de sinal da ERK. A compreensão da via de transdução de sinais das proteínas ERK 1 e 2 poderá fornecer parâmetros para um possível manipulação das funções celulares, evitando-se respostas indesejáveis ou obtendo-se as mais desejáveis, permitindo posterior estudo de novos medicamentos menos nocivos a saúde humana e mais eficiente contra os tripomastigotas.

2. METODOLOGIA

2.1 – Protocolo de infecção experimental, inoculação e determinação da curva de parasitemia

Dois camundongos machos *Swiss Webster* infectados com a cepa isolada de um paciente chagásico do Hospital das Clínicas da UFG foram submetidos a procedimentos de determinação da parasitemia. Administrou-se o inóculo em oito camundongos, na dose de 0,1 ml (10,000) por via intraperitoneal. Determinou-se a curva de parasitemia pelo exame direto, retirou-se uma gota de sangue da extremidade posterior da cauda de cada animal e observou-se em microscópio de campo claro onde se realizou a contagem dos tripomastigotas presentes em 100 campos.

2.2 -Protocolo para imunoistoquímica

Utilizaram-se anticorpos primários dirigidos contra a forma ativa da MAPK p 42/44 (ERK 1/2) na diluição 1:500 e anticorpo secundário anti-coelho na diluição de 1:500 (ARAÚJO et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Determinação da curva de parasitemia e determinação do número de amostras

A partir do 6º dia de contagem houve um aumento da concentração de tripomastigotas no sangue dos animais, atingindo o pico no 15º. A partir desse ponto a curva começa a declinar e no 21º atingindo um platô. Do 6º dia até o 21º caracteriza-se a fase crônica da doença e do 21º dia em diante a fase aguda como descreve SINAN (2004).

Ao lançar os dados no gráfico proposto por WILLIAMS (1977), foi possível perceber o momento em que todas as medidas permaneceram dentro dos valores aceitáveis de variação das amostras.

3.2 - Avaliação morfométrica das amostras

O resultado da avaliação morfométricas demonstrou que houve aumento significativo na expressão da proteína ERK 1/2 nos corações de camundongos infectados com *T.*

cruzi na fase crônica (Tabela 1) e uma diminuição também significativa dessa proteína em corações de camundongos infectados com *T. cruzi* na fase aguda (Tabela 2).

TABELA 1: Resumo da análise de variância realizada para comparar o grupo crônico com o seu respectivo controle.

RESUMO

Grupos	Número de amostras	Soma	Média	Variância
Crônico	50	154,83	3,0966	3,094492
Controle crônico	50	65,78	1,3156	0,312021

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	79,29903	1	79,29903	46,557	7,42E-10	3,938112
Dentro dos grupos	166,9192	98	1,703257			
Total	246,2182	99				

TABELA 2: Resumo da análise de variância realizada para comparar o grupo agudo com o seu respectivo controle

RESUMO

Grupos	Número de amostras	Soma	Média	Variância
Agudo	50	278,91	5,5782	3,434901
Controle agudo	50	323,54	6,4708	5,028538

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	19,91837	1	19,91837	4,70692	0,032459	3,938112
Dentro dos grupos	414,7085	98	4,231719			
Total	434,6269	99				

Pesquisas sobre a via de transdução de sinal das proteínas MAPK demonstram o envolvimento das mesmas em uma grande variedade de resposta celular como proliferação, diferenciação e morte celular (MORONI et al., 2004). Bueno et al. (2000) observaram que MEK1-ERK1/2 sinalizam um potencial regulador da hipertrofia cardíaca *in vivo*, ao gerarem ratos geneticamente modificados que expressavam uma forma ativada de MEK1 no coração. Esses ratos caracterizavam-se por hipertrofia cardíaca concêntrica, taquicardia e resistência a estímulos para apoptose. Por outro lado, outros ratos modificados expressaram diferentes sinais cardíacos como cardiopatia letal. Hassan (2006) observou um aumento da expressão da ERK em artéria carótida de camundongos infectados os com *T. cruzi* com 20 dias de infecção (fase aguda) e com 90 dias de infecção (fase crônica) No presente experimento também foi observado aumento na ativação de ERK em corações de camundongos na fase crônica da infecção; contudo, na fase aguda houve uma queda significativa da proteína ERK 1/2. Considerando tais evidências, é possível afirmar que a ativação da proteína ERK 1/2 desempenha papel importante na doença de Chagas principalmente na fase crônica da

doença onde foi demonstrado neste trabalho um aumento significativo de sua expressão (Figura 1) que está relacionado com sinais importantes e característicos da doença de Chagas como, por exemplo, miocardite cardiopatias crônicas. Já na fase aguda da doença se encontrou, neste trabalho, uma diminuição da expressão da proteína ERK 1/2 o que contradiz o experimento de Hassan (2006).

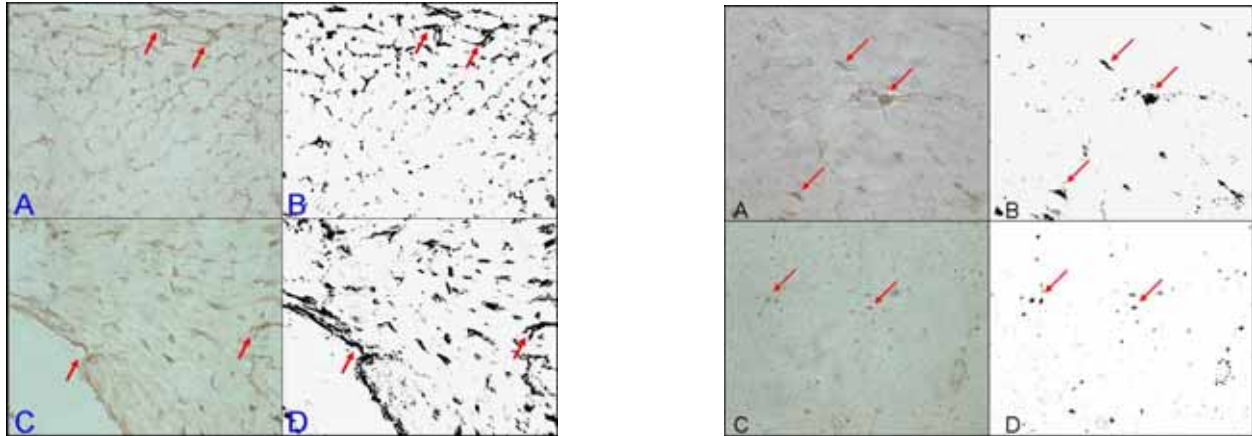


FIGURA 1: Fotomicrografias de coração de camundongo infectado com *T. cruzi* marcadas pelo anticorpo ERK1/2. A direita fase aguda e A e B e esquerda fase crônica e seus respectivos controles C e D

4. CONCLUSÃO

Após a avaliação dos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que houve um aumento significativo da ativação da via ERK nos cardiócitos na fase crônica e uma diminuição desta ativação na fase aguda da infecção chagásica em camundongos infectados experimentalmente. No interstício do miocárdio observou-se um aumento da via de ERK 1/2 principalmente no grupo crônico e no endotélio de vasos sanguíneos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, E. G.; BIANCHI, C.; SATO, K.; FARO, R.; LI, X. A. SELLKE, F. W. Inactivation of the MEK/ERK pathway in the myocardium during cardiopulmonary bypass. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 121, n. 4, p. 773-81, 2001.
- BUENO, O.F.; WINDT, L.J.; TYMITZ, K.M.; WITT, S.A.; KIMBALL, T.R.; KLEVITSKY R.; HEWETT, T.E.; JONES, S.P.; LEFER, D.J.; PENG, C.; KIYSIS, R. N.; MOKKENTIN, J.D. The MEK-1-ERK1/2 signal pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. **The EMBO Journal**. Heidelberg, vol.19, n. 23, p. 6341-6350, 2000.
- HASSAN, G. S.; MUKHERJEE, S.; NAGAJYOTHI, F.; WEISS, L. M.; PETKOVA, S. B.; ALMEIDA, C. J.; HUANG, H.; DESRUISSEAU, M. S.; BOUZAHAZAH, B.; PESTELL, R. G.; ALBANESE, C.; CHRIST, G. J.; LISANTI, M. P.; TANOWITZ H. B. *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. **Infection and Immunity**. v. 74, n. 1 p. 152-159, 2006.

¹ Bolsista de iniciação científica. Escola de Veterinária – Setor de Patologia Animal, tatyps1@hotmail.com

² Doutorando em Ciência Animal EV/UFG; Prof. Depto Medicina Veterinária EV/UFG

³ Doutoranda em Ciência Animal EV/UFG; Profa. Patologia Geral IPTSP/UFG

⁴ Orientador/Escola de Veterinária/UFG, earaujo@vet.ufg.br