UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**GH: Sua administração e os caminhos envolvidos na resposta
imune e na cardioproteção durante a Doença de Chagas
experimental**

Luis Marcio Balbierato

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**GH: Sua administração e os caminhos envolvidos na resposta
imune e na cardioproteção durante a Doença de Chagas
experimental**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientado(a): Luis Marcio Balbierato

Orientador(a): Prof. Dr. José Clóvis do
Prado Junior

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Balbierato, Luis Marcio

GH: Sua administração e os caminhos envolvidos na resposta imune e na cardioproteção durante a Doença de Chagas experimental. Ribeirão Preto, 2019. 52p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: do Prado Junior, Prof. Dr. José Clóvis

1. *Trypanosoma cruzi*.
2. Hormônio do crescimento (GH).
3. Doença de chagas.

Luis Marcio Balbierato

GH: Sua administração e os caminhos envolvidos na resposta imune e na cardioproteção durante a Doença de Chagas experimental.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientador(a): Prof. Dr. José Clóvis do
Prado Junior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

BALBIERATO, L. M. GH: **Sua administração e os caminhos envolvidos na resposta imune e na cardioproteção durante a Doença de Chagas experimental.** 2019. 52f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A doença de Chagas é uma das doenças negligenciadas mais importantes da América Latina, chegando a aproximadamente 8 milhões de infectados em todo mundo. Embora os mecanismos imunológicos que conferem a proteção ou promovem a formação das lesões cardíacas durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* ainda não estejam completamente esclarecidos, estudos evidenciam que a cardiopatia chagásica crônica apresenta pior prognóstico sendo consequência de uma resposta imune exacerbada. Dentre as inúmeras patologias causadas durante a fase crônica, o sistema cardíaco parece ter maior importância. Alguns estudos sugerem um importante papel do hormônio do crescimento (GH – *Growth Hormone*) na regulação da função cardíaca e na modulação do sistema imunológico. Diante disso, esse projeto teve como objetivo avaliar o possível efeito imunomodulador, durante a fase crônica da doença de Chagas experimental. Como modelo experimental utilizou-se ratos Wistar Hanover machos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Para isto, diferentes parâmetros foram avaliados: imunológicos (Dosagem de citocinas, IFN- γ , IL10, IL-2, IL-17 por ELISA) e População celulares por citometria de fluxo. Foi notado uma diminuição significativa nas populações celulares T CD8+, NK e NKT, assim como o aumento da população de linfócitos T reguladores (CD3+ CD4+ Foxp3). Nossos dados sugerem um papel importante do hormônio GH na modulação de resposta inflamatória na fase crônica da Doença de Chagas experimental, uma vez que a frequência de populações celulares, como os linfócitos T CD8+, células NK e NKT foram moduladas negativamente pelo tratamento hormonal, enquanto que a porcentagem de linfócitos T reguladores (CD3+ CD4+ Foxp3+) foram promovidos. O conjunto dos dados gerados, nos leva a sugerir atuação benéfica do GH na regulação de resposta inflamatória exacerbada.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Hormônio do crescimento (GH), Doença de chagas.

Abstract

BALBIERATO, L. M. **GH: Its administration and the pathways involved in immune response and cardioprotection during experimental Chagas Disease.** 2019. 52f. Dissertation (Master). Ribeirão Preto College of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Chagas disease is one of the most important neglected diseases in Latin America, reaching approximately 8 million infected people worldwide. Although the immunological mechanisms that confer protection or promote the formation of cardiac lesions during *Trypanosoma cruzi* infection are not yet fully understood, studies show that chronic chagasic heart disease has a worse prognosis as a consequence of an exacerbated immune response. Among the numerous pathologies caused during the chronic phase, the cardiac system seems to be of major importance. Some studies suggest an important role of growth hormone (GH) in regulating heart function and modulating the immune system. Therefore, this project aimed to evaluate the possible immunomodulatory effect during the chronic phase of experimental Chagas disease. As experimental model, male Wistar rats were infected intraperitoneally with the Y strain of *T. cruzi*. On the late phase of disease, different parameters were evaluated: immunological (cytokine dosage TNF- α , IFN- γ , IL10, IL-2, IL-17 by ELISA) and cell population by flow cytometry. There was a significant decrease in CD8 +, NK and NKT T cell populations, as well as an increase in the regulatory T lymphocyte (CD3 + CD4 + Foxp3) population. Our data suggest an important role of GH hormone in the modulation of inflammatory response in the chronic phase of experimental Chagas disease, since the frequency of cell populations, such as CD8 + T lymphocytes, NK and NKT cells were negatively modulated by hormone treatment, while that the percentage of regulatory T lymphocytes (CD3 + CD4 + Foxp3 +) were increased. The set of data generated leads us to suggest beneficial action of GH in the regulation of exacerbated inflammatory response.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Growth hormone (GH), Chagas' disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos B na fase crônica da doença de Chagas experimental	26
Figura 2. Efeito do tratamento com GH na frequência de Macrófagos na fase crônica da doença de Chagas experimental	27
Figura 3. Efeito do tratamento com GH na frequência de células dendríticas na fase crônica da doença de Chagas experimental	28
Figura 4. - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental (CD3+ CD4+)	29
Figura 5. Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental (CD3+ CD4+ CD28)	30
Figura 6. Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental (CD3+ CD4+ CD11a+)	31
Figura 7. Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental (CD3+ CD4+ Foxp3)	32
Figura 8. Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental (CD3+ CD8+)	33
Figura 9. Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental (CD3+ CD8+CD11a+)	34
Figura 10. Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. CD3+ CD8+ CD28+)	35
Figura 11. Efeito do tratamento com GH na frequência de Células NK na fase crônica da doença de Chagas experimental	36
Figura 12. Efeito do tratamento com GH na frequência de Células NKT na fase crônica da doença de Chagas experimental	37
Figura 13. Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IFN- γ na fase crônica da doença de Chagas experimental	39
Figura 14. Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IL-17 na fase crônica da doença de Chagas experimental	40
Figura 15. Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IL-10 na fase crônica da doença de Chagas experimental	41
Figura 16. Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IL-2 na fase crônica da doença de Chagas experimental	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais.....	21
Tabela 2 – Marcadores celulares analisados.....	23
Tabela 3 – Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica das células esplênicas.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GH	Growth Hormone
WHO	World Health Organization
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
ELISA	The enzyme-linked immunosorbent assay
CCC	Cardiopatía Chagásica Crônica
PCR	Polimerase Chain Reaction
NO	Óxido Nítrico
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
CD	Cluster of Differentiation

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas	IV
Lista de Abreviaturas e Siglas	V
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Doença de chagas.....	13
1.2. Ciclo Evolutivo.....	15
1.3. Doença de Chagas e o Sistema Imune.....	16
1.4. O Hormônio do Crescimento (GH) e o Sistema Imune.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS GERAIS.....	20
3.1. Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODO.....	21
4.1. Grupos Experimentais.....	21
4.2. Infecção, Tratamento e Rotina experimental.....	22
4.3. Eutanásia dos animais.....	22
4.4. Quantificação de parasitas.....	22
4.5. Protocolos Experimentais.....	23
4.5.1. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) - Dosagem de citocinas.....	23
4.5.2. Análise fenotípica das populações celulares.....	23
4.6. Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Citometria de fluxo (Análise de população celular).....	25
5.2. ELISA (Dosagem de Citocinas).....	38

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de chagas

A doença de Chagas tem sua origem documentada no estado de Minas Gerais, no Brasil, tendo sido descoberta pelo jovem médico e pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro Chagas no ano de 1909. Além da doença, ele também identificou seu vetor, os triatomíneos conhecidos popularmente como barbeiro e o seu agente etiológico, o protozoário *T. cruzi* (ANDREOLLO, 2009)

Em todo o mundo, estima-se que aproximadamente 8 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* e sua grande maioria está concentrada na América latina, região endêmica da doença. Porém, esse quadro vem sofrendo alterações a cada década, devido a intensa migração de pessoas portadoras da tripanosomíase americana para distintos territórios à procura de trabalho, onde a transmissão não é vetorial e sim por transfusão ou congênita, como por exemplo, América do Norte, Europa, Japão e Austrália. (WHO, 2019)

No Brasil, a doença de Chagas é considerada um problema médico-social grave, sendo a quarta causa de morte relacionada a doenças infecto-parasitárias em pessoas acima de 45 anos. Seu agente etiológico é o protozoário *T. cruzi*, que apresenta um ciclo biológico do tipo heteroxênico, passando por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos pertencentes a sete ordens diferentes) e extracelular no inseto vetor (triatomíneos) (NEVES, 2004).

Além da transmissão vetorial, existem outras formas de contágio, como transmissão transfusional, transmissão transplacentária (congênita) e a oral, que atualmente apresenta um grande aumento de casos de infecção no Brasil (VINHAES e DIAS, 2000; ALBUQUERQUE et al., 2015)

Em hospedeiros imunocompetentes, o processo infeccioso da fase aguda da doença é controlado através da resposta imunológica, tanto celular quanto humoral, dirigida contra o parasita, ocasionado assim uma redução da carga parasitária sanguínea até o aparente desaparecimento das formas tripomastigotas à medida que a imunidade humoral ganha espaço. Um percentual destes indivíduos passa

para uma fase assintomática, nos quais somente exames sorológicos podem indiretamente confirmar a infecção. Inúmeros fatores, no entanto, podem afetar a evolução da doença, tais como tipo de cepa, resposta imune do hospedeiro, dimorfismo sexual, alimentação, dentre outros. Dessa forma, vários anos após o contágio inicial, uma porcentagem de indivíduos infectados poderá apresentar manifestações cardíacas e/ou anormalidades gastrointestinais enquanto a maioria permanece assintomática (fase crônica), (Garcia *et al.*, 2005).

Estas alterações têm sido descritas tanto em humanos, quanto em modelos experimentais da doença de Chagas (CRUZ *et al.*, 2016).

É importante destacar que a cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a forma mais grave da doença, podendo acometer cerca de 10 a 20% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, com prevalência ainda elevada em nosso meio. Entre os sintomas clínicos pode-se citar: taquicardia, hipertrofia ventricular, distúrbios de repolarização e outras alterações elétricas. Tal patologia é causa frequente de internação hospitalar e também responsável pelo contingente elevado dos pacientes com indicação de transplante cardíaco (Almeida, 1996). Adicionalmente, em decorrência de tais alterações a principal causa de mortalidade é a morte súbita, que ocorre como consequência de arritmias polimórficas e insuficiência, que são causadas pela redução acentuada da função cardíaca. (CRUZ *et al.*, 2016)

Através do uso de técnicas imunohistoquímicas e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Urbina, 2010) descreve uma correlação direta entre o parasitismo e as reações inflamatórias que ocorrem no miocárdio. Assim, atualmente existe um consenso entre os pesquisadores de que ambos, persistência do parasito e resposta imune inadequada, desencadeiam uma reação inflamatória prolongada, constituindo a base das lesões características da doença de Chagas (Medina *et al.*, 2017; Gutierrez *et al.*, 2009; Marin-Neto *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2009; Talvani; Teixeira, 2011; Tarleton, 2007).

1.2. Ciclo evolutivo

T. cruzi é um protozoário flagelado da classe Kinetoplastea, família Trypanosomatidae. Suas principais características são a presença de apenas um flagelo e uma organela encontrada dentro da mitocôndria, chamada cinetoplasto. Essa estrutura armazena o DNA (k-DNA) do parasita. (DIAS e COURA, 1997)

No hospedeiro invertebrado, *T. cruzi* é encontrado em sua forma epimastigota no intestino médio e tripomastigota metacíclico na ampola retal. Já nos vertebrados, os tripomastigotas metacíclicos eliminados nas fezes e urina do vetor, penetram pelo local da picada e interagem com células da pele ou mucosas. Neste local, ocorre a transformação dos tripomastigotas em amastigotas, que aí se multiplicam por divisão binária simples. A seguir, ocorre a diferenciação das amastigotas em tripomastigotas, que são liberadas da célula hospedeira caindo no interstício e consequentemente, na corrente sanguínea, atingindo outras células de qualquer tecido ou órgão para cumprir o novo ciclo celular ou são destruídos por mecanismos imunológicos do hospedeiro. No início da infecção do vertebrado (fase aguda), a parasitemia é normalmente elevada, apesar da baixa taxa de mortalidade. Porém à medida que as ações conjuntas das respostas celulares e humorais se estabelecem, a parasitemia diminui, deixando o agente etiológico confinado em diferentes tecidos sob a forma amastigota intracelular. Na fase crônica, o encontro de parasitas sanguíneos é muito raro, só sendo detectados por métodos especiais, como a hemocultura, por exemplo. No homem, a evolução e o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da fase crônica da doença de Chagas ocorrem lentamente, após 10 a 15 anos de infecção ou mais. (NEVES et al., 2004; REY, 2010; COURA & PEREIRA, 2012)

1.3. Doença de Chagas e o Sistema Imune

Durante a fase aguda, a infecção por *T. cruzi* interfere no sistema imune do hospedeiro, induzindo o aumento da concentração de citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ produzidas pelos macrófagos. Esta resposta imune, por sua vez, ativa células CD4+

e CD8+, desencadeando a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos (ALIBERTI *et al*, 1996; ABBAS, 2005). A produção de óxido nítrico é fundamental, uma vez que esta molécula participa diretamente no controle da replicação parasitária, conforme estudos realizados em modelos experimentais. (BORGES *et al.*, 2009).

Já na fase crônica, em indivíduos que desenvolvem cardiomiopatia, notamos um aumento nas populações de células Natural Killers (NK) e NKT. Elas atuam ativamente nos tecidos com infiltrado inflamatório, danificando-o e o substituindo por tecido fibroso, agravando a lesão. (BRAZÃO, *et. al.* 2015).

As natural killers (NK) são células efetoras do sistema imune inato e formam a primeira linha de defesa contra os patógenos. São membros da família de células linfoides. Sua ação citotóxica é imediata, não requer a ação de antígenos e é orquestrado de uma maneira única por uma matriz de receptores com funções ativadoras ou inibitórias. (BECKER, *et. Al.* 2016).

As células NKT, também citotóxicas, compartilham características de células NK e Linfócitos T, apresentando o marcador CD3+ e o receptor TCR, podendo também apresentar os marcadores CD4 e CD8, assim como a molécula típica de NK, a CD161. (SEMEÃO, 2015).

Com relação à ativação de células T em pacientes chagásicos crônicos, foi demonstrado que indivíduos com a forma clínica indeterminada ou cardíaca da doença de Chagas apresentam uma alta frequência de células T CD4+ e CD8+ circulantes sem a molécula de superfície CD28. Células T ativadas, particularmente a subpopulação de células CD8+, também foram encontradas no infiltrado inflamatório de lesões cardíacas. (SOARES, 1999 e RASSI JR, 2017)

1.4. O Hormônio do Crescimento (GH) e o Sistema Imune

O hormônio do crescimento, também chamado de hormônio somatotrófico ou somatotropina, (GH da nomenclatura inglesa Growth Hormone) é uma molécula pequena de proteína, contendo 191 aminoácidos em cadeia única, com peso molecular aproximado de 22 kilo daltons. (GUYTON, 2011). É um importante hormônio hipofisário envolvido primariamente no crescimento e metabolismo humano. Em mamíferos o GH também funciona como um importante modulador do sistema imunológico (KELLEY, 1990). Ele estimula a proliferação de células semelhantes a osteoblastos provenientes das trabéculas ósseas (KASSEM *et al.*, 1993) ou de linhagens celulares semelhantes a osteoblastos (BARNARD *et al.*, 1991). Além disso, aumenta os níveis de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) durante a fase aguda experimental. (FRARE, *et. al.*, 2010). Sua liberação no organismo é controlada por hormônios hipotalâmicos. O GHRH (Hormônio liberador do hormônio de crescimento) estimula, enquanto que o GHIH (Hormônio inibidor do hormônio do crescimento) inibe sua secreção. (GUYTON, 2011)

O GH induz o fígado e outros tecidos em menor proporção, a formar diversas proteínas pequenas, chamadas de *somatomedinas*, que apresentam o efeito potente de aumentar todos os aspectos do crescimento ósseo. Elas apresentam funções de crescimento semelhante à insulina e conseqüentemente, as somatomedinas também são chamadas de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). (GUYTON, 2011)

Alguns estudos sugerem um importante papel para o eixo GH/IGF-I na regulação da função cardíaca, em que o excesso ou déficit desses hormônios estaria associado a uma alteração na estrutura do miocárdio e seu desempenho (PENNA *et al.*, 2013).

Uma das conseqüências da inflamação cardíaca crônica durante a doença de Chagas é a remodelação e danificação de diferentes proteínas pertencentes à maquinaria contrátil. Os níveis de troponina I são significativamente maiores em

pacientes chagásicos com cardiomiopatia do que em pacientes com a forma indeterminada da doença ou em pacientes não infectados, observando-se em alguns casos que a gravidade da cardiomiopatia pode ser relacionada aos níveis elevados de troponina T. (CRUZ *et al.*, 2016)

Até recentemente, no entanto, o interesse sobre os efeitos cardiovasculares do GHRH, hormônio hipotalâmico, principal estimulador da produção de GH, tem sido muito escasso. O pré-tratamento com GHRH melhora a recuperação pós-isquêmica na pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo e reduziu o desenvolvimento da contração diastólica. O efeito protetor do GHRH foi confirmado em miócitos ventriculares de rato adulto, em que o hormônio impediu a apoptose induzida por privação de soro ou tratamento com isoproterenol. (PENNA *et al.*, 2013).

Como descrito previamente, a insuficiência cardíaca, que também é um dos sintomas clínicos na fase crônica da doença, é uma das principais causas de mortalidade no mundo além de ser responsável por um grande número de hospitalizações. (NADERI *et al.*, 2015)

Além disso, o GH também apresenta-se como um modulador do sistema imune, regulando produção de citocinas (FRARE, *et. al.*, 2010) e também de populações celulares. (KELLEY, 1990).

2. JUSTIFICATIVA

Mesmo com todo o avanço científico nos últimos anos no sentido de melhor compreender a resposta imune dos hospedeiros e a sua relação com as diferentes patologias, a doença de Chagas continua sendo um grande desafio para a ciência. O único fármaco (Benzonidazol) atualmente disponível no Brasil para tratamento da tripanosomíase americana, apresenta-se ineficaz na fase crônica. Dessa forma, a busca de novas estratégias terapêuticas, capazes de modular a resposta imunológica contribuindo para prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença, são alvos importantes para o tratamento da doença de Chagas.

Já está bem estabelecido na literatura de que vários hormônios interferem no desenvolvimento e estabelecimento de diferentes patologias. Como exemplo, apresentamos a ação benéfica dos hormônios GH/IGF-1 na função cardíaca, seus efeitos imunoregulatórios no desenvolvimento e funcionamento do timo (Kelley 1990), bem como sua influência na produção de anticorpos e redução da atividade de células NK (Natural Killers).

Com base nessas informações e levando em consideração a escassez de trabalhos que descrevam a interação entre o GH e a doença de Chagas, esse projeto busca a relação direta entre a administração exógena do GH e seus possíveis efeitos imunomodulatórios durante a fase crônica da doença experimental. Os resultados deste trabalho, bem como a análise da relação entre o GH e a doença abrem portas para futuros trabalhos nesse segmento, podendo revelar uma alternativa de tratamento mais eficaz.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação da resposta imunológica em ratos *Wistar Hannover*, subsequente à administração de GH durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*.

3.1. Objetivos específicos

Avaliação de parâmetros imunes:

- Quantificação de citocinas inflamatórias/modulatórias no baço: IFN- γ , IL-2, IL-17;
- Quantificação de citocinas anti-inflamatórias na fase crônica da doença de Chagas: IL-10.
- Determinação dos linfócitos através dos marcadores: CD3, CD4, CD8, CD28, NK (CD161), NKT (NK1.1+ CD3), CD4;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado 16 ratos machos Wistar Hannover, na fase adulta jovem (4 semanas), pesando entre 90 e 100 gramas, provenientes de uma colônia mantida no Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, mantidos a uma temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro 12/12 horas, com livre acesso à água e ração. A caixa foi forrada com maravalha e trocada duas vezes na semana. O projeto foi avaliado pelo comitê de ética para o uso de animais do Campus da USP de Ribeirão Preto (CEUA). Foi utilizado 4 animais por grupo. Eles permaneceram no Biotério convencional da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sendo mantidos, no máximo, três ratos por gaiola para evitar o estresse de superpopulação. Todos os experimentos foram conduzidos com a aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (Processo número 17.1.405.60.2). *ad libitum*

4.1. Grupos Experimentais

Os animais, em cada experimento, foram divididos em: Grupo I – controle (C); Grupo II – Controle tratado com GH (CGH); Grupo III – Infectado (I); Grupo IV – Infectado tratado com GH (IGH).

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais

Infectados pela Cepa Y <i>T. cruzi</i> n=4	Grupos Não Infectados (Controles) n=4
Infectados controles (I) – Grupo III	Controle (C) – Grupo I
Infectados tratados com GH (IGH) – Grupo IV	Controles tratados com GH (CGH) – Grupo II

4.2. Infecção, Tratamento e Rotina experimental.

Os animais dos grupos III e IV foram infectados intraperitonealmente (i.p.) com 1×10^5 formas de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (BRAZÃO, et. al. 2015). Os testes de parasitemia foram realizados no 7º, 9º e 11º dia após a infecção. A escolha destes dias é baseada no perfil da curva parasitêmica, na qual o pico para ratos ocorre, normalmente, entre o 7º e o 9º dia. (LOPES & DO PRADO, 2007). Após 60 dias do inóculo, que já caracteriza a fase crônica (BRAZÃO, et. al. 2015), os grupos II e IV foram tratados em dias alternados, por 15 dias, via subcutânea com GH recombinante humano (Sigma hGH) a uma dose de 5ng/10g de peso do corpo, dissolvido em água destilada estéril.

Os experimentos foram realizados no 76º dia (60 dias de infecção e 15 dias de tratamento) após o inóculo infectante para todos os grupos.

4.3. Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados previamente com Tribromoetanol (2,5%) a uma dose de 0.1mL por 10g do peso do corpo, administrados intraperitonealmente, com posterior decapitação (BRAZÃO, et. al. 2015). O procedimento foi realizado individualmente em sala separada da sala de alojamento, evitando assim o possível estresse dos outros animais durante a eutanásia.

4.4. Quantificação de parasitas

A determinação da parasitemia foi feita pelo método de Brener (BRENER, 1962), que consiste em colocar uma alíquota de 5µL de sangue em lâmina, cobrindo-a com lamínula de 22 x 22 mm. Determina-se o número de parasitas em 50 campos microscópicos. O número encontrado é multiplicado por um fator, calculado

para cada microscópio e lente objetiva, levando em consideração o número de campos microscópicos existentes na área da lamínula.

4.5. Protocolos Experimentais

4.5.1. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) - Dosagem de citocinas

Os níveis de citocinas (IFN- γ , IL10, IL-2, IL-17) no baço dos animais foram detectados pela técnica de ELISA, conforme descrito previamente por Filipin e colaboradores (FILIPIN *et al.*, 2010).

4.5.2. Análise fenotípica das populações celulares

O baço foi removido e as células esplênicas obtidas por maceração em peneiras de aço inox com porosidade em 4 mL de meio de RPMI 1640. A análise fenotípica das populações celulares (CD3, CD4, CD8, CD28, NK, NKT, CD 45) foi realizada por citometria de fluxo, baseada em anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, dirigidos contra antígenos de superfície dessas células.

Tabela 2: Marcadores celulares analisados

Descrição	Marcadores Celulares
Marcadores de célula T auxiliar e citotóxica	CD3, CD4, CD8
Moléculas coestimuladoras	CD28, CD11a
Marcadores de célula NK e NKT	CD3, CD161
Marcador de macrófago	Macrophage subset
Marcador de célula B	CD45RA

Tabela 3: Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica das células esplênicas

Anticorpo	Clone	Concentração
Anti-CD3 - APC/FITC	1F4	0,2mg/mL;0,5mg/mL
Anti-CD4 - PE/PECy7	OX-38/OX-35	0,2mg/mL
Anti-CD8 – PercP	OX-8	0,2mg/mL
Anti-CD28 – PE	JJ319	0,2mg/mL
Anti-CD45RA – PE	OX-33	0,2mg/mL
Anti-CD161 – FITC	10/78	0,5mg/mL
Anti-CD11a - FITC	WT.1	0,2mg/mL
Anti- <i>Macrophage subset</i> – PE	HIS36	0,2mg/mL

4.6. Análise estatística

Os dados dos experimentos foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism versão 5.0. A comparação entre os grupos será realizada através de análise de variância: One-Way ANOVA. As comparações post-hoc foram realizadas com o teste de Bonferroni. O nível de significância será de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 – Citometria de fluxo (Análise de população celular)

Os animais foram eutanasiados no 76º dia do início do experimento, após 15 dias de tratamento com o hormônio, realizados após o 60º dia, em dias alternados. O baço foi coletado, macerado e utilizado para a realização da Citometria de fluxo, juntamente com os marcadores específicos de cada população analisada.

Linfocitos B (CD45+)

As células B, responsáveis pela produção de anticorpos que podem neutralizar o parasito no meio extracelular, tem grande capacidade de proliferação e se mostram altamente ativadas na fase aguda da doença de chagas (ACOSTA, 2003) e (ACOSTA, 2007). Avaliamos neste trabalho a frequência dessas células no baço, e, assim como esperado, não houve alteração significativa nessa população na fase crônica.

Figura 1 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos B na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de células CD45+ foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em media $\pm$ SEM (n = 4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Macrófagos

Macrófagos são células importantes durante a resposta imune contra o *T.cruzi*. Este tipo celular medeia funções tais como apresentação antigênica, ativação de células linfoides e *killing* parasitário. Esta população também não mostrou diferença significativa na fase crônica.

Figura 2 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Macrófagos na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de Macrófagos foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Células Dendríticas (CD11b/c+)

Outro tipo celular relevante na resposta imune contra o *T. cruzi* são as células dendríticas, por processarem e apresentarem peptídeos proteicos do parasito para células T, acarretando na ativação dessas células (RAMPAZO, 2015). Quando analisamos os grupos controles, notamos uma diferença significativa nessas células. O grupo tratado com o GH apresenta redução em relação ao grupo não tratado. Os grupos infectados não temos alterações significativas. Nos grupos infectados não foram detectadas alterações significativas.

Figura 3 - Efeito do tratamento com GH na frequência de células dendríticas na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de CD11b/c+ foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram

expressos em média $\pm$ SEM ($n = 4$ animals). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

Linfócitos T Auxiliares (CD3+ CD4+)

Após ativadas, as células T mantêm a resposta imune, que, durante a fase crônica, pode levar ao dano cardíaco (FIOCRUZ, 2019). Aqui notamos um aumento nas populações de linfócitos T CD3+ CD4+ em relação ao grupo controle e infectado.

Figura 4 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento

com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de CD3+ CD4+ foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Linfócitos T Auxiliares (CD3+ CD4+ CD28+)

Apesar do aumento da população de Linfócitos T CD3+ CD4+ constatado na figura acima, notamos uma queda bastante significativa quando analisamos nessa mesma população, as células ativadas.

Figura 5 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento

com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de CD3+ CD4+ CD28 foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Linfócitos T Auxiliares (CD3+ CD4+ CD11a+)

Assim como outras populações, essa também não apresentou diferença significativa.

Figura 6 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A

quantificação de CD3+ CD4+ CD11a+ foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em media $\pm$ SEM (n = 4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Linfócitos T reguladores (CD3+ CD4+ Foxp3)

Durante a fase crônica, as células T reguladoras apresentam papel importante suprimindo a resposta que pode ser danosa aos tecidos do hospedeiro (VITELLI-AVELAR, 2005). Ao analisarmos mais uma vez a população CD3+ CD4+, notamos um grande aumento na população que expressa a molécula Foxp3 nos grupos tratados em relação aos não tratados, o que indica o aumento dos linfócitos T reguladores.

Figura 7 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de

cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de CD3+ CD4+ Foxp3 foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n=4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Linfócitos T Citotóxicos (CD3+ CD8+)

Células T citotóxicas ativadas desempenham papel importante no dano tecidual durante a fase crônica da doença de chagas (FIOCRUZ, 2019). Nesta figura, constatamos uma grande diminuição nesta população, tanto comparando os grupos controle e infectado, quanto o grupo infectado tratado e não tratado.

Figura 8 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar

Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de CD3+ CD8+ foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Linfócitos T Citotóxicos (CD28+ e CD11a+ em CD3+ CD8+)

Na análise das populações CD3+ CD8+ que expressaram as moléculas CD28+ e CD11a+ não foi constatado alterações significativas.

Figura 9 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de

cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de CD3+ CD8+ CD11a foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em media $\pm$ SEM (n=4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Figura 10 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Linfócitos T na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação de CD3+ CD8+ CD28+ foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em media $\pm$ SEM (n=4 animais). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Células NK (CD161+)

Assim como as células T CD3+ CD8+, como já citado, as células NK apresentam ação citotóxica, podendo atuar no dano tecidual na fase crônica da doença de chagas (FIOCRUZ, 2019). Aqui, notamos uma grande diferença quando comparamos tanto os grupos controles, onde o controle tratado apresenta um grande aumento em relação ao controle não tratado, quanto os dois grupos tratados (Controle + Infectado), onde notamos uma diminuição significativa no grupo infectado tratado.

Figura 11 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Células NK na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e

Infectado+GH. Os resultados foram expressos em media $\pm$ SEM (n = 4 animals). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Células NKT (CD3+ CD161+)

As células NKT são importantes na regulação da resposta imune, desempenhando papel importante no controle do parasito. Assim como as células NK, na figura acima (Figura 11), a população de células NKT apresentou uma grande diferença quando comparamos tanto os grupos controles, onde o controle tratado apresenta um grande aumento em relação ao controle não tratado, quanto os dois grupos tratados (Controle + Infectado), onde notamos uma diminuição significativa no grupo infectado tratado.

Figura 12 - Efeito do tratamento com GH na frequência de Células NKT na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar

Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 animals). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

5.2 – ELISA (Dosagem de Citocinas)

Os animais foram eutanasiados no 76º dia do início do experimento, após 15 dias de tratamento com o hormônio, realizados após o 60º dia, em dias alternados. O baço foi coletado, macerado e utilizado para a realização da ELISA, juntamente com os marcadores específicos de cada citocina analisada.

A produção de citocinas por células do sistema imune inato e adquirido, assim como outros tipos celulares pode acarretar na ativação ou supressão da resposta imune. Os níveis das citocinas IFN- γ , IL10, IL-2, IL-17, no baço dos animais não apresentaram alterações significativas, como mostram a figura 13, figura 14, figura 15 e figura 16.

Figura 13 - Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IFN- γ na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 animals). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Figura 14 - Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IL-17 na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM (n = 4 animals). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

Figura 15 - Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IL-10 na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em média $\pm$ SEM ($n = 4$ animals). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

Figura 16 - Efeito do tratamento com GH na frequência da citocina IL-2 na fase crônica da doença de Chagas experimental. Ratos machos de linhagem Wistar Hannover foram infectados de forma intraperitoneal com 1×10^5 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*. No 76º dia de infecção, e após 15 dias alternados de tratamento com o hormônio GH, os animais foram sacrificados, seguido da coleta dos baços. A quantificação foi determinada nos grupos: controle, controle GH, Infectado e Infectado+GH. Os resultados foram expressos em media $\pm$ SEM (n = 4 animals). O teste One-way ANOVA / Bonferroni's foi utilizado para análise estatística para comparação de todos grupos (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001).

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Diferentemente do quadro da fase aguda descrita por ALIBERTI (1996), onde foi descrito um aumento na população de Linfócitos T CD4+, CD8+, Macrófagos, NK, e assim consequentemente de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFN- γ , neste trabalho, nas *figuras 8, 11 e 12*, notamos a diminuição das principais populações que auxiliam no surgimento de lesão no tecido cardíaco durante a fase crônica da doença de chagas, os Linfócitos T CD8+, Células NK e NKT. Assim, como já descrito por Brazão (2015), Soares (1999) e Rassi Jr. (2017), a ação citotóxica dessas populações é também extremamente nociva ao tecido que se encontra o infiltrado inflamatório, pois, além de combater o patógeno, elas também agredem as células locais, levando-as a morte.

Embora a imunidade humoral desempenhe papel importante na doença de Chagas, neutralizando e facilitando a destruição do parasito por fagócitos, não observamos diferença na frequência de células CD45+ no baço durante a fase crônica. O mesmo resultado foi descrito por Brazão (2015) em um estudo que envolvia o tratamento com zinco e melatonina em ratos com doença de Chagas crônica experimental.

A frequência de macrófagos no baço, assim como as células CD45+, não se mostrou alterada nos diferentes grupos quando comparados entre si. Dado semelhante foi observado por Brazão (2015), no mesmo modelo de infecção.

Por outro lado, o tratamento com o hormônio GH durante a fase aguda da doença, descrita por FRARE (2010), mostrou o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ e neste trabalho, nas *figuras 13, 14, 15 e 16*, não foi detectada alteração nos níveis destas citocinas, assim como as IL10, IL-2 e IL-17, o que aponta para um cenário de suposta estabilidade no sistema imune, talvez ligado ao fato de que nenhum órgão (coração) do grupo dos animais infectados ainda apresentava sinais de cardiomegalia.

Na *figura 4*, vemos um aumento na população de Linfócitos T CD3+ CD4+, porém, na *figura 5*, ao procurar pela molécula de ativação destas celular (CD28+), notamos um diminuição significativa devido ao efeito do tratamento hormonal. O CD28 é uma proteína de membrana que se liga diretamente as moléculas de CD80 e CD86 expressas por células apresentadoras de antígeno e que fornecem sinais co-estimulatórios necessários para ativação e sobrevivência de células T (ESENSTEN, 2016). Em modelo de linfopenia crônica, observou-se significativa influência do hormônio GH na expressão de CD28+ em linfócitos T CD8+. (PORTO, 2004)

Ao analisar os Linfócitos T reguladores na *figura 7*, (CD3+ CD4+ Foxp3), constatamos um aumento nesta população decorrente do tratamento com o hormônio GH, o que aponta para uma regulação benéfica na fase crônica, já que esses linfócitos agem diretamente na regulação da resposta imune exacerbada (ABBAS, 2005). As células Foxp3+ tem sido associadas a um melhor prognóstico quanto ao surgimento de lesões digestivas bastante observadas na fase crônica da Doença de Chagas, por mecanismos relacionados a diminuição da inflamação desencadeada por linfócitos ativados. Pacientes cardíacos por complicações relacionadas a infecção por *T. cruzi*, possuem baixa expressão gênica para Foxp3+, porém altos níveis de expressão de citocinas como IFN- γ e TNF- α quando comparados a indivíduos chagásicos assintomáticos (DA SILVEIRA, 2009). Alguns autores sugerem que o sistema hormonal pode agir diretamente na modulação de células T Foxp3+. Em modelo animal, o tratamento com glicocorticoides aumentou a frequência relativa de células T reguladoras no timo dos animais. A melatonina, hormônio regulador do ciclo circadiano, atua de maneira importante na regulação negativa de células T CD4+ CD25+ Foxp3+. (UGOR, 2018)

Os quadros descritos acima, indicam uma ação imunoreguladora positiva em relação às consequências da doença na fase crônica, assim como a diminuição das principais células responsáveis pelo dano tecidual nesta fase, CD3+ CD8+, NK e NKT, que, diante de uma inflação no tecido cardíaco,

causada pelos ninhos do parasita, atacam os patógenos e conseqüentemente, os cardiomiócitos, levando essas células a morte.

Em um modelo de doença de Chagas crônica experimental que envolvia o tratamento de zinco e melatonina, mostrou um aumento significativo de células NK e NKT no baço de animais infectados, quando comparados aos controles. Embora não tenhamos observado este aumento, o tratamento com GH em animais infectados reduziu frequência de células NK e NKT no baço, sugerindo que GH pode atuar como regulador negativo da inflamação na fase crônica da doença de Chagas, já que, nessa fase, células NK e NKT agem destruindo células danificadas e infectadas, gerando dano tecidual.

Nosso sistema, na tentativa de recuperar o que foi perdido, substitui essas células por tecido fibroso, que por sua vez, não consegue desempenhar o mesmo papel que o tecido cardíaco. Sendo assim, o órgão aumenta de tamanho mas perde sua capacidade de desempenhar sua função de forma eficiente, levando assim a problemas cardíacos característicos de pessoas com a doença desenvolvida. (KANASHIRO-TAKEUCHI, 2015)

Os resultados deste trabalho abrem margens para futuras investigações neste segmento e indica uma possível ação benéfica do tratamento com o hormônio GH durante a fase crônica da Doença de chagas.

7. REFERÊNCIAS

A resposta imunológica dos portadores da doença de Chagas. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/resposta-imune/>>. Acesso em 11 junho, 2019.

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 308, 2005.

ACOSTA, R.; ZUÑIGA, E.; MONTES, C. L.; GRUPPI, A. Interleukin-4 biases differentiation of B cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice and restrains their fratricide: role of Fas ligand down-regulation and MHC class II-transactivator up-regulation. *J Leukoc Biol.* 2003 Jan;73(1):127-36.

ACOSTA, R.; ZUNIGA, E. I.; MONTES, C. L.; MERINO, M. C.; BERMEJO, D. A.; AMEZCUA, V. M. C.; MOTRAN, C. C. *Trypanosoma cruzi* Infection Beats the B-cell Compartment Favours Parasite Establishment: Can we Strike First?. *Scand J Immunol.* 2007 Aug-Sep;66(2-3):137-42.

ALBUQUERQUE, J.B.; SANTOS, D.S.; PEREZ, A.R.; BERBERT, L.R.; VLIET, E.S.; OLIVEIRA, D.A. F., MOREIRA, O. C., ROGGERO, E., CARVALHO-PINTO, C. E., JURBERG, J., COTTA-DE-ALMEIDA, V., BOTTASSO, O., SAVINO, W., MEIS, J. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2015 Jun; 9(6).

ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 Mediates Resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. . *Infection and immunity*, 1996 Jun; 64(6):1961-7

ALMEIDA D.R. Transplante cardíaco no tratamento da miocardiopatia chagásica. TESE- São Paulo: Universidade Federal de São Paulo 1996.

ANDREOLLO, N. A.; DOS SANTOS, E. F.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, vol.25 no.1, 2012.

BARNARD, R.; NG, K.W.; WATERS, M.J.; 1991 Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology*, 128:1459–1464

BECKER, P. S. A.; SUCK, G.; NOWAKOWSKA, P.; ULLRICH, E.; SEIFRIED, E.; r BADER, P.; TONN, T.; SEIDL, C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* (2016) 65:477–484.

BORGES, C. R. B.; RODRIGUES, V. JR.; DOS REIS, M. A.; CASTELLANO, L. R.; CHICA J. E. L.; PEREIRA, S. A. L.; SANTOS, E. S.; RODRIGUES, D. B. R. Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.42 no. 2, 2009.

BRAZÃO, V.; SANTELLO, F. H.; FILIPIN, M. D. V.; AZEVEDO, A. P.; TOLDO, M. P. A.; DE MORAIS, F. R.; DO PRADO JR, J. C. Immunoregulatory actions of melatonin and zinc during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Pineal Res.* 2015; 58:210–218.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst Med Trop São Paulo.* v. 4, p. 389-396, 1962.

CRUZ, J.S.; MACHADO, F.S.; ROPERT, C.; ROMAN-CAMPOS, D. Molecular mechanisms of cardiac electromechanical remodeling during Chagas disease: Role of TNF and TGF- β . *Elsevier*, 2016.

COURA, J. R.; PEREIRA, J. B.; Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45, p. 286-296, 2012.

DA SILVEIRA, A. B.; DE ARAÚJO, F. F.; FREITAS, M. A GOMES, J. A.; CHAVES, A. T. Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum Immunol.* 2009 Jan;70(1):65-7.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R., Org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.

ESENSTEN, J. H.; HELOU, Y, A. CHOPRA, G.; WEISS, A.; BLUESTONE, J. A. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*. 2016 May 17;44(5):973-88.

FILIPIN, Mdel. V.; CAETANO, L. C.; BRAZÃO, V.; SANTELLO, F. H.; TOLDO, M. P. A.; DO PRADO, J. C. JR. DHEA and testosterone therapies in *Trypanosoma cruzi*-infected rats are associated with thymic changes. *Research in Veterinary Science* 89, 98–103, 2010.

FRARE, E. O.; SANTELLO, F.A.; CAETANO, L.C.; CALDEIRA, J.C.; TOLDO, M. P. A.; DO PRADO JR, J.C. Growth hormones therapy in immune response against *Trypanosoma cruzi*. *Research in Veterinary Science* 88, 2010, 273–278.

GARCIA S, RAMOS CO, SENRA JF, VILAS-BOAS F, RODRIGUES MM, CAMPOS-DE-CARVALHO AC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES M.B. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49:1521-1528.

GUTIERREZ F. R.S, GUEDES P.M.M, GAZZINELLI R.T, SILVA J.S, The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease: *Parasite Immunology* 2009;31:673-685.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2011.

KANASHIRO-TAKEUCHI, R, M SZALONTAY, L.; SCHALLY, A, V.; TAKEUCHI, L. M.; POPOVICS, P.; JASZBERENYI, M.; VIDAURRE, I. ZARANDI, M. New therapeutic approach to heart failure due to myocardial infarction based on targeting growth hormone-releasing hormone receptor. *Oncotarget*, vol. 6, No. 12.

KASSEM, M.; BLUM, W.; RISTELLI, J.; MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E.F. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcified Tissue International* 52: 222–226, 1993.

KELLEY, K.W. The role of growth hormone in modulation of the immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 594: 95–103, 1990.

LOPES, E. S. G.; DO PRADO, J. C. JR. A influência da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* no coração em ratos Wistar machos submetidos ao processo de adrenalectomia. *Biodiversidade*, v.6, n.1, 2007.

MEDINA, T. S.; OLIVEIRA, G. G.; SILVA, M. C.; DAVID, B. A.; SILVA, G. K.; FONSECA, D. M.; SESTI-COSTA, R.; FRADE, A. F.; BARON, M. A.; IANNI, B.; PEREIRA A. C.; CHEVILLARD, C.; CUNHA-NETO, E.; MARIN-NETO, J. A.; SILVA, J. S. Ebi3 Prevents *Trypanosoma cruzi*-Induced Myocarditis by Dampening IFN- γ -Driven Inflammation. *Frontiers in Immunology*, v.08, Article 1213, Sep. 2017.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol*, v. 64, n. 3, p. 475-82, Jun 1978.

NADERI, N.; HEIDARALI, M.; BARZEGARI, F.; GHADRDOOST, B.; AMIN, A.; TAGHAVI, S. Hormonal Profile in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Res Cardiovasc Med.* 4(3): e27631, 2015.

NEVES, D. P.; MELO A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

PENNA, C.; SETTANNI, F.; TULLIO, F.; TROVATO, L.; PAGLIARO, P.; ALLOATTI, G.; GHIGO, E.; GRANATA, R. GH-Releasing Hormone Induces Cardioprotection in Isolated Male Rat Heart via Activation of RISK and SAFE Pathways. *Endocrinology*, April 2013, 154(4):1624–1635

PORTO, G.; CRUZ, E.; MIRANDA, H. P.; PORTO, B.; VASCONCELOS, J. C.; LACERDA, R.; ROETTO, A.; DARAIO, F.; BACELAR, C. Growth hormone (GH)-induced reconstitution of CD8⁺ CD28⁺ T lymphocytes in a rare case of severe lymphopenia associated with Juvenile Haemochromatosis and Turner's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 Oct;61(4):437-40.

RASSI A JR, DIAS JC, MARIN-NETO JA, RASSI A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*. 2009 Apr;95(7):524-34.

RASSI JR, A.; DIAS JC, MARIN-NETO JA, RASSI A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 112(3): 224-235, March 2017.

RAMPAZO, E. V.; AMORIM, K. N.; YAMAMOTO, M. M.; PANATIERI, R. H.; RODRIGUES, M. M.; BOSCARDIN, S. B. Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. PLoS One. 2015 Feb 13;10(2).

REY, L.; *Bases da parasitologia médica*. 3.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RIBEIRO A.L, DOS REIS A.M, BARROS M.V, DE SOUSA M.R, ROCHA A.L, PEREZ A.A, PEREIRA J.B, MACHADO F.S, ROCHA M.O. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagas' disease. Lancet. 2002;360:461-462.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M.; The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of Toll-like receptors and perspectives for vaccine development. J Parasitol Res. 2012;2012:50787.

SEMEÃO, L. E. S. A. Funcionalidade das células Natural Killers T – NKT – na fisiopatogenia da Mielopatia associada ao HTLV/Paraparesia Tropical Espástica (HAM/TSP). Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 55, 2015.

SOARES, M. B. P.; DOS SANTOS, R. R. Immunopathology of Cardiomyopathy in the Experimental Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 257-262, 1999.

TALVANI A, TEIXEIRA M. M. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance, Adv Parasitol. 2011;76:171-194.

TALVANI A, ROCHA M.O, BARCELOS L.S, GOMES Y.M, RIBEIRO A.L, TEIXEIRA M.M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. Clin Infect Dis. 2004;38:943-950.

TARLETON R.L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Immunol. 2007.

UGOR, E.; PRENEK, L.; PAP, R.; BERTA, G.; ERNSZT, D. Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression. Immunobiology. 2018 Apr - May;223(4-5):422-431.

URBINA, J. A., 2010, Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches: Acta Tropica, v. 115, p. 55-68.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric Oxide Is Involved in Control of Trypanosomacruzi-Induced Parasitemia and Directly Kills the Parasite In Vitro. *Infectionandimmunity*, Nov. 1994, p. 5177-5182

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 16 (Sup. 2): 7-12, 2000.

VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J. C.; PASCOAL, V. P.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Chagastic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25 High regulatory T lymphocytes. Scand J Immunol. 2005 Sep;62(3):297-308.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
< <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 18 Maio. 2019.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "GH: sua administração e os caminhos entrelaçados entre a resposta imune e a cardioproteção durante a doença de Chagas", registrada sob nº 17.1.405.60.2, sob a responsabilidade de Luis Marcio Balbierato e José Clóvis do Prado Júnior, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 26/10/2017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	03/11/17 a 22/04/19
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogêneo Wistar Hannover
Nº de animais	72
Peso/Idade	120g/ 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central do Campus USP RP

Ribeirão Preto, 27 de outubro de 2017.

 Ana Patrícia Matsuda Natsui
 Coordenadora da CEUA-FCFRP