UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Parâmetros neuroimunoendócrinos da Doença de Chagas: qual a relação dos hormônios vasopressina e ocitocina e a resposta imune em ratos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*?

Lucas Favaretto Tazinafo

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Parâmetros neuroimunoendócrinos da Doença de Chagas: qual a
relação dos hormônios vasopressina e ocitocina e a resposta
imune em ratos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*?**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientado: Lucas Favaretto Tazinafo

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado
Júnior

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Biotecnologia em 19/09/2019. A versão original encontra-se
disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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.

Tazinafo, Lucas Favaretto

Parâmetros neuroimunoendócrinos da Doença de Chagas: qual a relação dos hormônios vasopressina e ocitocina e a resposta imune em ratos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*?

92 p.: il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: do Prado Jr, José Clóvis.

1. Inflamação. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Hormônios

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lucas Favaretto Tazinafo

Título do trabalho: Parâmetros neuroimunoendócrinos da Doença de Chagas: qual a relação dos hormônios vasopressina e ocitocina e a resposta imune em ratos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*?

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador: 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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra em especial para meu pai, minha mãe e meus irmãos, por todo o apoio nesta longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente à instituição, USP-RP, pelas garantias de espaço e os serviços, fundamentais para a realização deste projeto.

Ao professor José Clóvis do Prado Junior e toda a equipe do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, em especial à Vânia Brazão Muniz, Rafaela Pravato Colato, Amanda Goulart, Jefferson Luiz da Silva e Pedro Alexandre Sampaio.

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

À CNPq, processo: 168188/2018-7

À FAPESP, instituição apoiadora do projeto de pesquisa, n: 2015/09806-3

**“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida”.
(Carl Sagan)**

RESUMO

Tazinafo, L.F. Parâmetros neuroimunoendócrinos da Doença de Chagas: qual a relação dos hormônios vasopressina e ocitocina e a resposta imune em ratos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*? 2019. 92f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O mecanismo fisiopatológico da doença de Chagas envolve diversos aspectos fisiológicos e neuroimunoendócrinos do hospedeiro infectado, causando um amplo espectro de diagnósticos. A utilização de técnicas que permitem a amplificação dos genes de *T. cruzi* detectaram sua presença em diversos órgãos entre eles adrenais e hipófise de animais infectados. No entanto, são poucos os trabalhos que investigam as alterações na secreção dos hormônios neuro-hipofisários durante o processo de resposta ao *T. cruzi*. O objetivo desse trabalho é verificar parâmetros neuroimunoendócrinos de ratos Wistar adultos machos durante a resposta inflamatória na fase aguda da doença de Chagas. Para isso, verificamos o padrão de secreção da vasopressina (AVP) e a ocitocina (OT) na fase aguda da doença. Além disso, dosamos as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico (NO), além da análise fenotípica no baço, analisando os marcadores CD11b, CD11b/c, MHC-II, CD80, CD86, CD3, CD4, CD8 e Macrophage Subset em animais tratados e não tratados com OT. Nossos resultados mostram uma redução na secreção dos hormônios AVP e OT, enquanto fatores estimuladores para sua secreção, como o NO e o IFN- γ sérico se encontram aumentados, sinalizando a presença de algum efeito inibitório para a secreção desses hormônios. O tratamento com OT induz elevadas concentrações de NO, porém, em interação com a infecção, aumenta a produção de IL-2 e IL-6 no soro. Além disso, a OT aumenta a marcação MHC-II nas células CD11b e a marcação CD3+/CD4+. Conclusão: a OT atua imunomodulando a resposta imune do hospedeiro durante a fase aguda da tripanossomíase experimental, e a diminuição das concentrações de ocitocina durante essa fase pode ser decorrente de um dos inúmeros mecanismos de escape do parasita, diminuindo suas concentrações e consequentemente facilitando sua invasão no organismo do hospedeiro.

Palavras-chave: Inflamação, *Trypanosoma cruzi*, Hormônios.

ABSTRACT

Tazinafo, L.F. Neuroimmunoendocrine parameters of Chagas Disease: what is the relation of hormones vasopressin and oxytocin with the immune response in rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*? 2019. 92p. Thesis (Doctorate). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The pathophysiological mechanism of Chagas disease involves several physiological and neuroimmunoendocrinal aspects of the host, causing a broad spectrum of diagnoses. The use of techniques that allows the amplification of *T. cruzi* genes detected their presence in several organs, among them the adrenal and the pituitary gland of infected animals. The hypothalamus-pituitary hormones regulate the peripheral immune response. However, there are not many studies investigating the changes in secretion of posterior pituitary hormones during the immune process against the *T. cruzi*. The objective of this project is to investigate neuroimmunoendocrine parameters in adult male Wistar rats during the inflammatory response in the acute phase of Chagas disease. In order to accomplish that, we investigated the secretion of vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) in the acute phase of the disease after osmotic stimulus. In addition, we measured the IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α and Nitric Oxide (NO), and the phenotypical analysis of the spleen cells, analyzing CD11b, CD11b / c, MHC-II, CD80, CD86, CD3, CD4, CD8 and Macrophage Subset markers in treated and non-OT treated animals. Our results shows the reduction of AVP and OT secretion, while stimulating factors like IFN- γ and NO are increased, signaling the presence of some inhibitory effect in secretion of these hormones. Treatment with OT increases NO production, but, when interacting with the infection, it increases production of serum IL-6, and IL-2. Additionally, OT increases the RT1B signaling in CD11b cells and CD3+/CD4+ signaling. Conclusion: OT acts by immunomodulating the host's immune response during the acute phase of the experimental trypanosomiasis, and the lowered oxytocin concentration during this phase can be due to one of the many escape mechanisms of the parasite, reducing concentrations and hence facilitating invasion of host organism.

Keywords: Inflammation, *Trypanosoma cruzi*, Hormones

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Epidemiologia de <i>T.cruzi</i>	3
Figura 2. Diagrama da Neurohipófise.....	12
Figura 3. Semelhanças entre AVP e OT.....	12
Figura 4. Curva Parasitêmica	28
Figura 5. Efeito da desidratação sobre a osmolalidade em animais controles e infectados:.....	29
Figura 6. Secreção de AVP após desafio osmótico:	30
Figura 7. Secreção de OT após desafio osmótico:	31
Figura 8. Concentração de óxido nítrico no soro.....	32
Figura 9. Concentração de óxido nítrico no líquido cefalorraquidiano.....	33
Figura 10. Imunofenotipagem de leucócitos do baço: células CD11b/c ⁺ CD11b ⁺	35
Figura 11. Imunofenotipagem de leucócitos do baço: células CD11b/c ⁺ CD11b ⁻	37
Figura 12. Imunofenotipagem de leucócitos do baço: células CD3 ⁺	39
Figura 13. Imunofenotipagem de leuc[ocitos do baço: Macrófagos.	40
Figura 14. Concentração de IL-1 β :.....	41
Figura 15. Concentração de IL-2:	42
Figura 16. Concentração de IL-4:.....	43
Figura 17. Concentração de IL-6:	44
Figura 18. Concentração de IL-10:.....	45
Figura 19. Concentração de TNF- α :	46
Figura 20. Concentração de IFN- γ :.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de anticorpos monoclonais que foram utilizados na análise fenotípica das células esplênicas:.....	23
--	----

Abreviaturas e Siglas

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
APC – Célula Apresentadora de Antígenos
AVP - Vasopressina
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCC - Cardiomiopatia chagásica crônica
CEUA - COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS
CNPq – Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico E Tecnológico
CNS – Central Nervous System
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRH - Hormônio Liberador De Corticotrofina
DC – Doença de Chagas
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
eNOS - Sintase de Óxido Nítrico Endotelial
FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo
GH – Hormônio do Crescimento
HP – Hipotálamo-Hipófise
HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPR - Estreptavidina Peroxidase
IFN- γ – Intérféron Gama
IL-1 – Interleucina 1
IL-1 β – Interleucina 1 Beta
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-17 – Interleucina 17
iNOS -Óxido Nítrico Sintase Induzida
kg - Quilogramas
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
mL: Mililitros
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
MHC-II – Molécula de Histocompatibilidade Classe II
NH - Neurohipófise
NK – Natural Killer
nNOS - Sintase de Óxido Nítrico Neuronal
NO – Óxido Nítrico
NOS – Sintase de Óxido Nítrico
NO₂- - Nitrito
NO₃- - Nitrato
NTS - Núcleo Do Trato Solitário

OMS – Organização Mundial Da Saúde
ONOO- Peroxinitrito
OT - Ocitocina
OVLТ – Organum Vasculosus da Lamina Terminalis
PCR - Reação Em Cadeia De Polimerase
pg -Picogramas
PRL - Prolactina
PVN – Núcleo Paraventricular
RIE – Radioimunoensaio
SEM – Erro Padrão da Média
SNC – Sistema Nervoso Central
SON – Núcleo Supraótico
SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
TBE - Tribromoetanol
Th1 – T Helper 1
Th2 – T Helper 2
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
T.cruzi - *Trypanosoma cruzi*
UI – Unidade Internacional
VP – Vacúolo Parasitóforo
WHO – World Health Organization
 μ L – microlitro
 μ M – Micromolar

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	2
1.2. Fisiopatologia da Doença	3
1.3. Imunologia da Doença de Chagas	5
1.4. Interação Neuroimunoendócrina	7
1.5. Correlação entre a persistência do parasita e a severidade da doença de Chagas	8
1.6. Doença de Chagas e o Sistema Nervoso Central	9
1.7. Hormônios neurohipofisários vasopressina e ocitocina na resposta imune	11
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo	16
2.2. Objetivo específico	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Animais Utilizados para a pesquisa	18
3.2. Grupos Experimentais	18
3.3. Delineamento experimental, infecção, eutanásia dos animais e coleta de amostras:	19
3.4. Quantificação de parasitas	19
3.5. Tratamento com Ocitocina	20
3.6. Avaliação de Parâmetros Neuroimunoendócrinos no Plasma e Soro	20
3.6.1. Separação do plasma e do soro	20
3.6.2. Dosagem hormonal plasmática, por radioimunoensaio (RIE)	21
3.6.3. Dosagem de citocinas através do Ensaio imunoenzimático (ELISA):	21
3.7. Citometria de Fluxo no Baço	22
3.7.1 Análise fenotípica das populações celulares:	22
3.8. Coleta do líquido cefalorraquidiano	23
3.9. Quantificação indireta de Óxido Nítrico	23
3.11. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Curva de parasitemia após infecção por <i>T. cruzi</i>	28
4.2. Efeito da desidratação na osmolalidade	29
4.3. Efeito do estímulo osmótico sobre a secreção de AVP	30
4.4. Alterações na secreção de ocitocina após desidratação	31
4.5. Efeito do tratamento com ocitocina sobre a produção de óxido nítrico	32
4.6. Concentrações de óxido nítrico no LCR	33

4.7.	População CD11b/c ⁺ CD11b ⁺ e frequência dos marcadores CD80, CD86 e RT1B no baço.....	34
4.8.	Frequência de marcadores em células CD11B/C ⁺ / CD11b ⁻	36
4.9.	Efeito da OT sobre a população CD3 ⁺ /CD8 ⁺ e CD3 ⁺ /CD4 ⁺ no baço	38
4.10.	Alteração na subpopulação de macrófagos após tratamento com OT	40
4.11.	Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de IL1-β.....	41
4.12.	Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de IL-2	42
4.13.	Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de IL-4.....	43
4.14.	Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de IL-6	44
4.15.	Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de IL-10.....	45
4.16.	Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de TNF-α	46
4.17.	Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de IFN-γ	47
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8.	ANEXO	72

INTRODUÇÃO

1. Introdução.

1.1 Doença de Chagas

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, agente etiológico da doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana. A DC é uma infecção parasitária que foi primeiramente descrita em 1909, por Carlos Chagas, e ainda é considerada um sério problema em saúde pública na América Latina. Dados recentes destacam que em todo o mundo cerca de 8 milhões de pessoas encontram-se infectadas e estima-se uma mortalidade de 10.000 pessoas anualmente (CHAGAS, 1909; WHO, 2018; TORRES-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019).

A transmissão pode ser classificada em: primária (vetores biológicos, transfusão de sangue, congênita, e transmissão via oral), ou secundária (transplante de órgãos, secreções, acidentes de trabalho, etc.) (CHAGAS, 1909; DEANE, 1979; SHIKANAI-YASSUDA, 1990; REICHE; JANKEVICIUS, 1997). Atualmente, a forma mais importante de transmissão de *T. cruzi* ao homem é através da via oral e está associado à elevada taxa de mortalidade e morbidade, além da acentuada prevalência e gravidade da patologia cardíaca (miocardite) (DORN, 2007; PINTO *et al.*, 2013; ORTIZ *et al.*, 2019).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), por volta de 40 milhões de latino-americanos ainda correm risco de serem infectados com a doença de Chagas, havendo uma incidência de 100 a 200 mil novos casos de homens e mulheres contaminados todos os anos (MOREL; LAZDIS, 2003; WHO, 2010). No Brasil, estima-se que pelo menos um milhão de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi*, enquanto que a doença representa a quarta maior causa de mortes por doenças infecto-parasitárias no país, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) (VINHAES; DIAS, 2000; SILVA *et al.*, 2019).

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) gera prejuízos econômicos importantes com gastos de 1 bilhão de dólares/ano em decorrência de mortes ou invalidez (DUTRA *et al.*, 2014).

O combate global à infecção por *T. cruzi* tem fatores limitantes, como as deficiências de tratamentos, além da ausência de vacinas, dificuldades de diagnóstico clínico e a ampla distribuição mundial da DC, mesmo em países com ausência de vetor. Um dos mais sérios e recentes problemas relacionados à doença de Chagas é a sua transmissão em países não endêmicos para a doença, em que a transmissão ocorre principalmente por transfusões de sangue e transplantes de órgãos (**Figura 1**) (BERN *et al.*, 2011; NAVARRO *et al.*, 2012, ROMAY-BARJA *et al.*, 2019). O aumento da incidência da DC nesses países se deve ao fato de que a triagem para detecção de anticorpos contra *T. cruzi* não era executada em bancos de sangue. Em virtude da ausência de sintomas na maioria dos doadores, que muitas vezes não sabiam que portavam o agente causador da doença, esses doavam sangue ou órgãos contaminados, transmitindo assim a infecção para pessoas saudáveis. Esta situação se tornou crítica, e os bancos de sangue de alguns países agora possuem triagem obrigatória para essa doença (MONCAYO; YANINE, 2006; BERN *et al.*, 2011; DUTRA *et al.*, 2014).

Figura 1: Epidemiologia de *T. cruzi*:

<http://revistapesquisa.fapesp.br/2009/09/01/mais-uma-tentativa/>. (Acessado em 27/04/2019).

1.2 Fisiopatologia da Doença

A grande maioria dos pacientes, durante a fase aguda da doença, é assintomática ou apresenta oligossintomas, tais como febre ou desconforto muscular leve (mialgia), que dificultam o diagnóstico da DC. A reação inflamatória no local da

picada do vetor biológico, sintoma conhecido como chagoma de inoculação, bem como o sinal de Romana, que é decorrente da penetração do parasita pela conjuntiva ocular são evidências clínicas importantes na identificação da doença (BERN *et al.*, 2015; ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018).

Nessa fase da doença, conhecida como fase aguda, o número de tripomastigotas circulantes encontra-se aumentado, permitindo ao parasita infectar diversos tecidos ou tipos celulares, como tecido cardíaco, macrófagos, fibroblastos, neurônios e células epiteliais. Por estes motivos, ninhos de amastigotas, já foram descritos até mesmo em glândulas e tecido nervoso (PINTO *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2009). A parasitemia sanguínea é um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica da infecção, necessária para o estabelecimento da correlação anatomopatológica e monitoramento do processo de cura dos pacientes (SOGAYAR *et al.*, 1993).

Na ausência de tratamento adequado, cerca de 5% das pessoas morrem de miocardite aguda, porém, a maioria progride para a fase crônica da doença, acompanhada por parasitemia sanguínea indetectável. Entre 60-70% dos pacientes crônicos evoluem para a forma indeterminada da doença de Chagas e não apresentam sintomas clínicos associados à infecção, sendo apenas identificáveis após testes laboratoriais específicos (ROCHA, *et al.* 2007; MEYMANDI *et al.*, 2019; ORTIZ *et al.*, 2019). A infecção latente pode permanecer silenciosa por até aproximadamente 30 anos. Um terço dos pacientes que se encontram nesta fase podem desenvolver sinais clínicos específicos, tais como disfunção cardíaca crônica (cardiomiopatia chagásica crônica - CCC), megacólon ou megaesôfago (CLAYTON, 2010).

Acredita-se que a CCC possa ter um componente autoimune, com envolvimento de células auto-reativas T e B, além da persistência do parasita no tecido. (PUNUKOLLU *et al.*, 2007). A cardiomiopatia é a forma mais grave da DC na fase crônica. O grande número de formas amastigotas no tecido leva à resposta imune, com a consequente lesão do tecido cardíaco. O coração chagásico, nesta fase, aumenta de tamanho por conta da degeneração das fibras cardíacas, perdendo qualidade de sua função e tornando-se um dos principais responsáveis pelo aumento da mortalidade e morbidade nesta fase. (SAMUEL *et al.*, 1981; HIDRON *et al.*, 2010).

A doença de Chagas pode ser avaliada experimentalmente através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais, incluindo

roedores silvestres (BORGES *et al.*, 1992; PRADO *et al.*, 1998; PRADO *et al.*, 1999; DOST *et al.*, 2002; CAETANO *et al.*, 2006), camundongos (BRENER; CHIARI, 1963; CARDILLO *et al.*, 1996) e ratos (SANTELLO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007; BRAZÃO *et al.*, 2008), podendo reproduzir nos mesmos os distintos aspectos patológicos da doença humana.

1.3. Imunologia da Doença de Chagas

A infecção por *T.cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de respostas humorais e celulares específicas contra o parasita, fato de extrema importância na redução da carga parasitária (ALIBERTI *et al.*, 1996). A resistência do hospedeiro durante a infecção experimental por *T.cruzi* depende de uma ação conjunta da imunidade inata e adquirida, incluindo diversas células do sistema imune como macrófagos, células natural killer (NK), células T CD4⁺ e CD8⁺, assim como a produção de anticorpos por células B (BRENER; GAZZINELLI, 1997; MARTIN; TARLETON, 2004). Camundongos que apresentam uma resposta imune deficiente ao parasito, tais como animais knockout para células T CD8⁺, para a produção de IFN- γ e TNF- α ou para a secreção de óxido nítrico (NO), são altamente suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, apresentando elevadas taxas de formas amastigotas teciduais e mortalidade (TARLETON *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1995; TARLETON *et al.*, 1996).

Os macrófagos desempenham importante função contra a infecção por *T. cruzi* através da produção de mediadores inflamatórios, tais como óxido nítrico e peroxinitrito (ONOO⁻) (THOMSON *et al.*, 1999). Quando os macrófagos são ativados pelo reconhecimento do parasita, produzem NO, que atua no controle da replicação parasitária, devido a seu papel microbicida. O NO tem papel em uma variedade de funções biológicas em diferentes sistemas, tais como relaxamento da musculatura lisa vascular, agregação de plaquetas e a neurotransmissão (MONCADA; HIGGS, 2006; BORGES *et al.*, 2009).

O NO apresenta atividade não apenas contra patógenos intracelulares tais como *T. cruzi*, mas também atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (AKAMINE *et al.*, 2007; MARCACCINI *et al.*, 2007). NO é produzido pela enzima óxido

nítrico sintase (NOS), a qual possui três isoformas: endotelial (óxido nítrico sintase Endotelial – eNOS), induzida (iNOS) e neuronal (nNOS) (QUEIROZ; BATISTA, 1999). A iNOS é expressa por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células NK, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliais, miócitos e fibroblastos (VESPA *et al.*, 1994). Algumas interleucinas como IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e alguns produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), podem aumentar a expressão de iNOS. Por outro lado, os glicocorticóides e algumas citocinas como a IL-4, IL-8, IL-10, e TNF- β podem ser responsáveis por sua inibição (MONCADA *et al.*, 1994; MAYER; HEMMENS, 1997).

Diversos são os mecanismos de ação citotóxica do NO contra *T. cruzi*, mas supõe-se que o NO é capaz de interferir diretamente no metabolismo do parasito, como por exemplo, inibindo a atividade da enzima cruzipaina através das cisteíno proteases que tem um importante papel na nutrição e invasão celular por *T. cruzi*. Vários estudos (VENTURINI *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2000) descreveram a participação dos cardiomiócitos na atividade tripanosomicida dependente de NO. Os mesmos relatam que os cardiomiócitos estão relacionados aos fenômenos inflamatórios, secretando citocinas, quimiocinas e NO, o que pode atrair leucócitos para o foco inflamatório no intuito de controlar a replicação intracelular dos parasitos. Por outro lado, observou-se que, em modelo murino, o NO só é eficaz durante as primeiras duas semanas da fase aguda da doença, período em que as células NK controlam a infecção (SAEFTEL *et al.*, 2001). Entretanto, se as quantidades produzidas de NO forem excessivas, poderão lesar as células do hospedeiro resultando, por exemplo, a perda de neurônios do plexo mientérico durante a fase aguda, que posteriormente pode estar relacionado com o megaesôfago na fase crônica da doença bem como a cardiomiopatia (ARANTES *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o reconhecimento de *T. cruzi* por macrófagos, inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI *et al.*, 1996). Assim os macrófagos secretam IL-12 que ativa as células NK a produzirem IFN- γ (ALIBERTI *et al.*, 1996) que por sua vez age de modo parácrino nos macrófagos, estimulando a atividade microbicida (GAZZINELLI, *et al.*, 1992; REED, 1995). A citocina pró-inflamatória TNF- α , produzida por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* (TARLETON, 1988), participa dessa

interação de forma sinérgica tanto com IL-12 e IFN- γ (OSWALD *et al.*, 1992). Assim, IL-12 promove uma interação entre a imunidade inata e a adquirida por induzir a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4 em células Th1 produtoras de IFN- γ (ABBAS, 2005). Estudos utilizando animais IL-12 knock-out tem confirmado o importante papel desta citocina na resistência à infecção experimental por *T. cruzi* (MÜLLER *et al.*, 2001).

O IFN- γ , produzido por células NK e linfócitos T ativados, estimula a fusão do fagossoma com o lisossoma e a expressão do MHC de classe II nos macrófagos, efetivo na contenção da replicação intracelular (*in vivo* e *in vitro*) do parasita através da indução da biossíntese de NO por macrófagos ativados (ALIBERTI *et al.*, 1996).

1.4. Interação Neuroimunoendócrina

Os sistemas endócrino e imunológico são integrados bidirecionalmente com o sistema nervoso central através de um complexo mecanismo de interação, envolvendo diversos mediadores tais como citocinas, hormônios e neuropeptídeos que agem visando a manutenção do equilíbrio homeostático (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Diversos trabalhos enfatizam a importância de um adequado equilíbrio neste sistema imunoendócrino integrado, durante a evolução de processos infecciosos (KLEIN, 2004; ESCOBEDO *et al.*, 2005).

Durante a invasão de um patógeno, o hospedeiro provoca as primeiras reações de defesa tanto locais como sistêmicas, levando a uma produção de diferentes citocinas que irão induzir no hospedeiro as respostas imune inata e adaptativa bem como marcantes efeitos neuroendócrinos que por sua vez influenciarão a resposta imune, metabólica, endócrina e as funções neurais (SAVINO, 2017).

Estudos demonstram que o curso da doença de Chagas pode ser diretamente influenciado por fatores imunológicos e endócrinos (ROGGERO *et al.*, 2006; PÉREZ *et al.*, 2007; SAVINO *et al.*, 2007). Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α ativam o eixo hipófise-hipotálamo-adrenal (HPA), causando a elevação na produção de glicocorticóides. Outros estudos *in vivo* e *in vitro* destacam o papel da IL-

6 no aumento dos níveis de glicocorticóides produzidos pelas glândulas adrenais (SAVINO, 2017). Distúrbios nestes sistemas podem estar relacionados com a injúria tecidual, além de influenciar o curso de diversos estados infecciosos (BESEDOVSKY; DEL REY, 2000; ELENKOV *et al.*, 2005).

As características patológicas da infecção também estão associadas com a resposta inflamatória excessiva, mediada principalmente por TNF- α (ROGGERO *et al.*, 2002; ROGGERO *et al.*, 2004). Vários trabalhos mostram que TNF- α possui um papel duplo na proteção durante a infecção aguda por *T. cruzi*, (SILVA *et al.*, 1995; CASTAÑOS-VELES *et al.*, 1998), podendo também participar do dano tecidual (TRUYENS *et al.*, 1995; TRUYENS *et al.*, 1999).

Interessantemente, a redução na produção de outros hormônios hipofisários tais como PRL e GH foi observada tanto em modelos de camundongos como em estudos *in vitro* utilizando linhagens celulares de camundongo produtoras de GH/PRL, todos infectados com *T. cruzi* (CORRÊA-DE-SANTANA *et al.*, 2009; SAVINO, 2017). Assim os autores sugerem que a produção de PRL esteja alterada durante a infecção por *T. cruzi*.

Nesse contexto, embora os mecanismos envolvidos no comprometimento do balanço neuroimunoendócrino durante a doença de Chagas ainda não estejam completamente elucidados, sabe-se que ele é decorrente tanto das alterações endócrinas que ocorrem na infecção quanto da modulação no perfil de citocinas produzidas (Perez *et al.*, 2007). Embora ainda seja um assunto pouco compreendido, sabe-se que ambas as alterações podem favorecer a persistência parasitária, influenciando no desenvolvimento da patologia (Pérez *et al.*, 2011).

1.5. Correlação entre a persistência do parasita e a severidade da doença de Chagas

Hipóteses e controvérsias têm sido propostas para explicar o mecanismo envolvido na lenta, mas progressiva cardiomiopatia característica da doença de Chagas. Estas hipóteses incluem, entre outros, a destruição de células miocárdicas por parasitas (SANTOS-BUCH; ACOSTA, 1985), danos a gânglios parassimpáticos de órgãos alvo (KOBBERLE, 1974), anormalidades microvasculares (ROSSI, 1990) e

autoimunidade (CUNHA-NETO *et al.*, 1995; CUNHA-NETO *et al.*, 1996; ZHANG; TARLETON, 1999).

Estudos em humanos demonstraram que a intensidade da miocardite crônica correlaciona-se diretamente com o nível de antígenos do parasita no coração (HIGUCHI *et al.*, 1993). Trabalhos de JONES *et al.* (1993) e VAGO *et al.* (1996) detectaram DNA de *T. cruzi* somente nos órgãos que mostravam severa patologia. Estudos demonstram, portanto, que independente do mecanismo envolvido na destruição celular, a presença de parasitas tem papel crucial no desenvolvimento da patologia da doença de Chagas crônica, e sugere a perspectiva de protocolos terapêuticos que controlem a carga parasitária podendo com isso reduzir a patologia da doença de Chagas (MARINHO *et al.*, 1999).

1.6. Doença de Chagas e o sistema nervoso central

Já foi verificado em camundongos durante fase aguda da doença, que *T. cruzi* pode ser encontrado nas glândulas adrenais, enquanto a amplificação de gene específico do parasito, por reação em cadeia de polimerase (PCR), demonstrou que seu produto foi encontrado tanto nas adrenais quanto nas hipófises desses animais infectados. Além disso, uma diminuição da CRH e um aumento no teor de corticosterona foram detectados no hipotálamo e no soro de animais infectados, respectivamente. (CORRÊA-DE-SANTANA *et al.* 2006; DUTRA *et al.*, 2014).

A DC na fase aguda pode se apresentar com sintomas leves, incluindo malestar, cefaléia, mialgia, e linfadenopatia, ou uma doença mais grave, com anasarca (edema generalizado) e/ou dificuldade respiratória. Complicações neurológicas tais como meningoencefalite, chagoma tumoriforme e neuropatia ocorrem em até 10% dos pacientes na fase aguda da doença, sendo crianças e pessoas imunocomprometidas as mais suscetíveis às condições neurológicas mais graves (PITTELLA, 2009; PY, 2011; BERKOWITZ *et al.* 2015).

Disfunção autonômica e organomegalia são características da doença de Chagas crônica. As manifestações neurológicas da fase aguda da doença podem piorar a fase crônica desta enfermidade. Além disso, Doença de Chagas é considerada um fator de risco para o derrame isquêmico, provavelmente por

consequência da cardiomiopatia, assim como disfunção endotelial levando a aterosclerose em vasos cerebrais (OLIVEIRA-FILHO *et al.* 2005; PAIXÃO *et al.* 2009; PY, 2011). O desenvolvimento de comprometimento cognitivo após doença de Chagas foi descrito em caso-controle e em estudos de grande base populacional, mas uma relação entre a doença e o comprometimento cognitivo ainda não foi confirmada. (OLIVEIRA-FILHO *et al.* 2009; MAUD; QURESHI. 2010; PY. 2011).

O prejuízo do Sistema Nervoso Central (CNS) na fase crônica da doença de Chagas é controverso. Existem raros relatórios sobre demência, confusão, encefalopatia crônica, alterações sensoriais e motoras. Outros autores relatam perda neuronal, atrofia cerebral e prejuízos cognitivos (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2005; RODGERS, 2010; COUGO-PINTO *et al.*, 2013), porém, nenhum desses trabalhos é suficiente para esclarecer se estes achados neurológicos representam a manifestação clínica verdadeira da fase crônica da doença de Chagas. (BERKOWITZ *et al.*, 2015).

O envolvimento neurológico da DC pode ser definido através de diversos parâmetros: 1) detecção direta de tripomastigotas no líquido céfalo-raquidiano (LCR), 2) presença de amastigotas no tecido cerebral através de análise histológica, 3) presença de tripomastigotas sanguíneas através do exame direto do sangue, associados à manifestações neurológicas e clínicas após o estabelecimento da terapia específica (PITTELLA, 2009). Estes quadros são mais comumente encontrados em crianças abaixo de 2 anos de idade apresentando-se como uma encefalite invariavelmente associada à miocardite.

A reativação da DC em pacientes cronicamente infectados pode apresentar sinais neurológicos importantes secundariamente à presença de lesões na massa intracerebral ou meningoencefalite difusa. (PAGANO *et al.* 1999; DA MATA *et al.*, 2000; PITTELLA, 2009). O paciente frequentemente desenvolve febre, sinais e sintomas de hipertensão intracraniana, déficits focais, perda da consciência progressiva, dor de cabeça e tonturas (PRATA, 2001).

Exames por neuroimagens revelam anormalidades na maioria dos pacientes e abscessos cerebrais podem ser observados em mais de 50% dos casos. Lesões cerebrais simples ou múltiplas são geralmente localizadas na substância branca subcortical dos hemisférios (PRATA, 2001; PINAZO *et al.*, 2013).

1.7. Hormônios neurohipofisários vasopressina e ocitocina na resposta imune.

Os hormônios hipotálamo-hipofisários, tais como Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticóides modulam a secreção de citocinas próinflamatórias e a regulação da resposta imune periférica, mediando o controle das interações neuroimunoendócrinas (POZO; DELGADO, 2004; DUTRA *et al.*, 2014).

A vasopressina (AVP) e a ocitocina (OT) são hormônios neurohipofisários que possuem participação em funções comportamentais e cognitivas além de estarem relacionadas com a proteção de lesões teciduais, regulação da osmolalidade, volemia, termorregulação e liberação de ACTH (DUNN *et al.*, 1973; ELANDS *et al.*, 1992; KIMURA, 1995; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004; ISERI *et al.*, 2005; GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2007; SHARMAN, 2008).

Vários hormônios modulam a resposta funcional do sistema imune e inúmeras publicações demonstram a ação dos glicocorticoides e de outros hormônios que afetam a resposta imune, alguns estimulando e outros suprimindo. (CSABA, 2014; GIEFING *et al.*, 2015; STABILE *et al.*, 2016).

AVP e OT são hormônios sintetizados majoritariamente nos núcleos paraventriculares (PVN) e supraópticos (SON) do hipotálamo (Cunningham e Sawchenko, 1991). São transportados através de axônios que se projetam para a neurohipófise, e são secretados segundo estímulos fisiológicos adequados (Figura 2) (Sawchenko; Swanson, 1983; Cunningham; Sawchenko, 1991). O estímulo de liberação pode tanto ser para um dos hormônios ou como para os dois.

Figura 2. Diagrama da Neurohipófise.

<http://www.endocrinesurgeon.co.uk/index.php/what-is-the-hypothalamo-pituitary-axis>. Acessado em 05/11/2019

A ocitocina e a vasopressina diferem apenas em dois aminoácidos e, além de semelhantes estruturalmente, existe uma similaridade nas suas funções (Fig. 3)

Figura 3. Semelhanças entre AVP e OT. Ocitocina e vasopressina se assemelham em sete aminoácidos, e se diferenciam em dois aminoácidos. AVP possui Fenilalanina e Arginina e a Ocitocina possui Isoleucina e Leucina, (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; TAZINAFO, 2014).

Ocitocina	Vasopressina
1 Cisteína	1 Cisteína
2 Tirosina	2 Tirosina
3 Isoleucina	3 Fenilalanina
4 Glutamina	4 Glutamina
5 Asparagina	5 Asparagina
6 Cisteína	6 Cisteína
7 Prolina	7 Prolina
8 Leucina	8 Arginina
9 Glicina	9 Glicina

(TAZINAFO, 2014.)

AVP, ou hormônio antidiurético, é um hormônio essencial para a regulação do volume de fluidos no organismo, da osmolalidade e da constrição vascular. Também

participa de funções comportamentais e cognitivas, como estresse, reconhecimento social, respostas de medo, depressão e ansiedade (DUNN *et al.*, 1973; PEIXOTO, 2003; ANTUNES-RODRIGUES, *et al.*, 2004; GIUSTI-PAIVA, *et al.*, 2007). Ela também age como um neurotransmissor regulando o ritmo circadiano, a termorregulação e a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (SHARMAN, 2008).

OT exerce suas atividades através de receptores acoplados à proteína-G, que são amplamente expressos pelo corpo (ERBAS *et al.*, 2013; JANKOWSKI *et al.*, 2000; TAN *et al.*, 2007). A OT é liberada durante o parto ou a amamentação e está também relacionada com a proteção contra lesões teciduais (ELANDS *et al.*, 1992; KIMURA, 1995; ISERI *et al.*, 2005). As ações fisiológicas mais conhecidas estão relacionadas aos órgãos femininos, porém também possui ação na ejaculação e nos testículos com a diminuição da síntese de androgênicos (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; MCGREGOR; LANG, 2001). Outras funções da OT são aumento da secreção de insulina, oxidação da glicose e aumento dos triglicerídeos dos adipócitos, potencialização do efeito antidiurético e natriurético da AVP nos rins, efeito vasoconstritor e efeitos comportamentais (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; MCGREGOR; LANG, 2001). Porém, no rato, a OT também possui funções relacionadas ao equilíbrio da concentração de sódio e regulação da osmolalidade, da mesma forma que a AVP, sendo potencialmente natriurética e tendo as alterações osmóticas como um mecanismo de regulação de sua secreção (VERBALIS *et al.*, 1991; CONRAD *et al.*, 1993; BOURQUE; OLIET, 1997).

Outros estímulos como febre, aumento da angiotensina II, endotoxinas, estresse, náusea, IL-1, prostaglandinas, hipóxia e acidose também são capazes de estimular a liberação desses hormônios. (DUNN *et al.*, 1973; CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; LEONE; BOYLE, 2006).

O papel da ocitocina é bem conhecido na ejeção do leite e contração uterina durante o parto, e tem sido reconhecido como o “hormônio do amor”, como resultado do seu papel no vínculo entre a mãe e o filho. Além dos seus efeitos endócrinos, tanto a vasopressina como a ocitocina são considerados como reguladores da função imune. Altas concentrações de vasopressina e ocitocina precedem o aumento de NO plasmático na resposta inflamatória (OLIVEIRA-PELLEGRIN *et al.*, 2013). As ações da vasopressina podem ser mediadas por receptores de ocitocina, pois ambos os hormônios são estruturalmente semelhantes e apenas diferem em dois aminoácidos.

É possível que a vasopressina e a ocitocina se liguem ao mesmo receptor causando uma sinalização intracelular que resulta no aumento da produção de NO (STABILE *et al.*, 2016).

Alguns autores sugerem a existência de uma ligação entre os sistemas respiratório, cardiovascular e imune, em que o núcleo do trato solitário (NTS) no cérebro é o lugar de maior interação neuronal (THAYER *et al.*, 2011). A inflamação sistêmica pode alterar a dinâmica das células marca-passo, sendo que a endotoxemia tem sido associada a um desvinculamento das células marca-passo cardíacas de controle neural autonômico, resultando em uma diminuição dos valores de taxa cardíaca (GHOLAMI *et al.*, 2012). Por outro lado, estudos indicam que alguns peptídeos como a ocitocina possuem propriedades cardioprotetoras durante a injúria isquêmica de reperfusão (FAGHIHI *et al.*, 2012).

A ocitocina tem sido utilizada para a redução da extensão do infarto no miocárdio e arritmias ventriculares, sendo apontada como uma possível droga para tratamento de doenças isquêmicas do coração, contribuindo para o restabelecimento da pressão arterial média vida produção de óxido nítrico no tecido cardíaco e balanço entre as espécies reativas de oxigênio. Em modelo experimental de infarto do miocárdio, o tratamento com OT reduziu o número de células do sistema imune no tecido cardíaco e a causou a redução na expressão de mRNA para diferentes citocinas pró-inflamatórias no tecido cardíaco, podendo indicar um efeito imunomodulatório, com perfil de redução da infiltração de células imunes e regulação no perfil próinflamatório de citocinas no tecido. (JANKOWSKI *et al.*, 2009; FAGHIHI *et al.*, 2012; GUTKOWSKA *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

2. Objetivo:

Investigar parâmetros imunológicos teciduais e periféricos de ratos Wistar adultos machos, durante a resposta inflamatória na fase aguda da doença de Chagas, após o tratamento com Ocitocina.

2.1. Objetivo específico:

- Analisar as concentrações dos hormônios neurohipofisários: AVP e OT durante a fase aguda da doença de chagas.
- Analisar as concentrações de AVP e OT; frente a estímulo osmótico, durante a fase aguda da doença.
- Investigar o possível efeito benéfico dos hormônios neurohipofisários: AVP e OT; durante a fase aguda da doença.
- Investigar os diferentes parâmetros imunológicos: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , e NO.
- Investigar a expressão de marcadores de células do sistema imune no baço de animais tratados: MHC-II (RT1B), CD11B, CD11b/c, CD3, CD4 e CD8.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais utilizados para a pesquisa:

O projeto foi conduzido atendendo às normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA-Brasil, após aprovação do comitê de ética para o uso de animais (CEUA) do Campus da USP de Ribeirão Preto; Protocolo n: 16.5.249.60.7. Foi estabelecido o uso de 4 animais por grupo experimental e os experimentos foram realizados durante a fase aguda da doença. O modelo animal escolhido foi o de ratos machos da linhagem *Wistar*, na fase adulta jovem, pesando entre 200 a 250 gramas, provenientes de uma colônia mantida no Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram ambientados no biotério do Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, mantidos aos pares em suas caixas, em ambiente de temperatura controlada em $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e ração. Os pares de animais foram decididos após pesagem e relação por peso semelhante.

3.2. Grupos Experimentais:

Grupo I – Ratos não infectados e não submetidos a estímulo osmótico.

Grupo II – Ratos não infectados e submetidos a estímulo osmótico.

Grupo III – Ratos infectados e não submetidos a estímulo osmótico

Grupo IV – Ratos infectados e submetidos a estímulo osmótico

Grupo V – Ratos não infectados e tratados com ocitocina

Grupo VI – Ratos infectados e tratados com ocitocina

3.3. Delineamento experimental, infecção, eutanásia dos animais e coleta de amostras:

Os animais foram divididos inicialmente em dois grandes grupos: os animais infectados com *T. cruzi* e os animais do grupo controle (não infectados). Os animais foram inoculados intraperitonealmente com 1.0×10^5 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Y de *T. cruzi*. Essa cepa vem sendo mantida em camundongos Swiss não isogênicos, por repiques semanais de sangue contendo *T. cruzi*, desde seu isolamento, em 1953 por Silva; Nussenzweig (1953). Desde então essa cepa vem sendo mantida por meio de xenodiagnóstico tendo sido isolada de uma paciente na fase aguda da infecção (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

Os experimentos foram realizados no nono dia, durante a fase aguda da doença (PÉREZ *et al.* 2006; BRAZÃO *et al.*, 2018). Dois dias antes dos experimentos, um grupo de animais foi induzido ao estímulo osmótico (desidratação por retirada da água para beber de suas gaiolas durante dois dias), os animais controles tiveram acesso a água livremente. No dia do experimento, eles foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução 2,5% de Tribromoetanol (TBE, AldrichChem. Corp. Inc.) em solução salina, na dose de 1ml/100g de peso corporal do rato, e posteriormente submetidos à decapitação. Todas as coletas de amostras, ou eutanásia, foram feitas após o animal perder a consciência em decorrência da anestesia. A coleta de sangue foi realizada após a morte dos animais, sendo coletados cerca de 2 mL em tubo plástico contendo 200 µL de Heparina sódica (1 mL: 5.000 U.I.), para quantificação de parasitas, e obtenção do plasma e outros 2 mL de sangue em outro tubo de plástico sem anticoagulante, para obtenção de soro para análises imunológicas. Também foram extraídos o hipotálamo e baço dos animais.

3.4- Quantificação de parasitas:

A determinação da contagem de tripomastigotas sanguícolas foi feita pelo método de Brener (BRENER, 1962). Este método 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. As determinações foram feitas diariamente, ao longo de dezesseis dias, para a determinação do pico de parasitemia. As coletas dos resultados diários da parasitemia, formam o que é denominado de curva parasitêmica, a qual representará a carga parasitária tanto dos animais tratados com ocitocina, como os não tratados, em duas curvas distintas.

3.5. Tratamento com ocitocina:

Um grupo de animais sadios e um grupo de animais infectados foram submetidos ao tratamento por ocitocina (OT; 3 UI/kg administrado subcutaneamente). A adição de ocitocina foi feita durante os últimos 5 dias antes da data de coleta de amostras e 5 horas antes do início das coletas, em função da curta meia vida deste hormônio (ELORZA-ÁVILA *et al.*, 2016; GUTKOWSKA *et al.*, 2016). A OT utilizada é considerada padrão em pesquisa científica, pela *European Pharmacopeia*, número de referência O0700000 (Sigma Aldrich), mantida em freezer -20°C na forma pura, em frasco original lacrado

3.6. Avaliação de parâmetros neuroimunoendócrinos no plasma e soro

3.6.1. Separação do plasma e do soro

Após a morte dos animais, foram coletadas duas amostras de sangue do tronco do animal, no local da decapitação: uma parte do sangue foi coletada, em tubos plásticos, mantidos em gelo, contendo heparina e centrifugada a 3500 rpm por 30 minutos para obtenção do plasma. A outra fração do sangue foi coletada em microtubos sem anticoagulante e centrifugada a 3500 rpm por 30 minutos para a obtenção do soro. Estas amostras de soro foram utilizadas para a quantificação de citocinas e NO. O plasma e o soro foram armazenados a -80°C após a coleta e até o momento das dosagens

3.6.2. Dosagem hormonal plasmática, por radioimunoensaio (RIE)

A determinação das concentrações dos hormônios neurohipofisários AVP e OT no plasma foram realizadas no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob a orientação do Professor Dr. José Antunes Rodrigues, utilizando a técnica de radioimunoensaio, sendo todas as amostras provenientes de um mesmo experimento. A técnica consiste em uma competição de anticorpos primários e secundários por antígenos da amostra, em concentração desconhecida, e antígenos marcados com o radioisótopo I¹²⁵. Os peptídeos marcados foram separados dos não marcados utilizando um anticorpo secundário produzido no laboratório em que o ensaio foi realizado (ELIAS *et al.*, 1997; TAZINAFO, 2014).

Para a preparação da amostra, o volume de 1 mL de plasma foi separado para extrair os hormônios usando acetona e éter de petróleo. O produto final da extração foi liofilizado e estocado em -20°C até o início do RIE. Os hormônios AVP e OT foram dosados utilizando-se antissoros específicos em diluição final de 1:60.000 e 1:90.000, respectivamente.

3.6.3 Dosagem de citocinas através do Ensaio imunoenzimático (ELISA):

Níveis séricos de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α

A quantificação de citocinas foi realizada utilizando kits da empresa R&D systems, em placas de 96 poços já sensibilizadas com anticorpos de captura para as citocinas de interesse, específicos para amostras de ratos. A curva padrão foi preparada em seis microtubos, através de diluição seriada 1:1, do primeiro ao sexto tubo. O branco foi feito apenas com a adição do reagente diluente (0pg/ml). Tanto a curva padrão, como o branco e as amostras testes foram adicionadas em duplicatas, na placa de 96 poços. Foram adicionados 50 μ L das amostras experimentais nos demais poços (em duplicata). Em seguida, adicionaram-se 100 μ L do anticorpo anti-IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α , às placas, seguido de incubação conforme recomendações do fabricante dos kits. Após a incubação as placas foram lavadas quatro vezes com 400 μ L/poço de tampão de lavagem.

A revelação enzimática foi feita pela adição de 100µL/poço de estreptavidina-peroxidase diluída em tampão de diluição (120 µL de HPR diluído em 12 mL tampão de diluição), e as placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente. Após novo ciclo de quatro lavagens, foi adicionado substrato cromógeno 100 µL/poço, incubando novamente por 30 min, protegendo da luz e parando a reação com a adição de 100µL de solução de parada (H₃PO₄ 1M). As densidades ópticas (D.O.) das placas foram lidas em leitor de microplacas (Teccan, Modelo Sunrise- µQuant) em um comprimento de onda de 450nm (BRAZÃO *et al.*, 2015)

3.7. Citometria de Fluxo no Baço

3.7.1 Análise fenotípica das populações celulares:

Após a morte do animal, o baço foi extraído cirurgicamente e as células esplênicas foram obtidas após maceração do tecido em peneiras esterilizadas de aço inox em 4ml de meio de RPMI 1640. A análise das populações celulares foi realizada por citometria de fluxo, utilizando os marcadores apresentados na Tabela 1, baseada em anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, dirigidos contra antígenos de superfície dessas células. A técnica de citometria de fluxo foi empregada para entender a relação entre as alterações nas populações de células do sistema imunológico no baço e a ocitocina na fase aguda da DC; esse trabalho observa as alterações nos marcadores celulares RT1B (MHC Classe II), CD11b, CD11b/c, CD80, CD86, CD3, CD4, CD8 e macrophage subset, permitindo-nos comparar as frequências na população de macrófagos; ativação e proliferação de células de origem mielóides; ativação e proliferação de células de origem linfóides, após o tratamento com ocitocina, ou veículo (Salina) no baço dos animais infectados ou sadios.

O conteúdo celular do baço foi calibrado para 2×10^6 células por ml antes de serem expostas aos anticorpos com diferentes combinações de marcadores fluorescentes. As amostras foram armazenadas em temperatura de 4°C, no escuro, em solução PBS com 1% de paraformaldeído, em placas de 96 poços. As análises dos resultados foram possíveis usando um citômetro de fluxo da Becton Dickinson FACScan com o software DIVA-BD (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

Tabela 1: Relação de anticorpos monoclonais que foram utilizados na análise fenotípica das células esplênicas: As pesquisas foram realizadas em três tubos diferentes, provenientes da mesma amostra. Tubo 1 - marcadores de células da linhagem mielóide. Tubo 2 marcadores de macrófagos. Tubo 3 marcadores celulares da linhagem linfóide.

Tubo	Anticorpo	Clone	Concentração
1	Anti-CD11b/c-PE-Cy7	OX-42	0,2mg/mL
	Anti-CD11b-APC	M1/70	0,2mg/mL
	Anti-CD80 PE	3H5	0,2mg/mL
	Anti-CD86 FITC	24F	0,5mg/mL
	Anti-RT1b PerCP	OX-6	0,2mg/mL
2	Anti-Macrophage Subset PE	HIS36	0,2mg/mL
3	Anti-CD3 FITC	1F4	0,5mg/mL
	Anti-CD4 PE-Cy7	OX-35	0,2mg/mL
	Anti-CD8 PerCP	OX-8	0,2mg/mL

3.8. Coleta do líquido cefalorraquidiano

A técnica para a coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) seguiu o método padronizado e descrito por Consíglío (CONSÍGLIO; LUCION, 2000). Após o animal ser anestesiado e estar fixado ao aparelho estereotático, em decúbito ventral com o focinho voltado para baixo, é possível visualizar uma pequena depressão entre a protuberância occipital e o processo espinhoso da vértebra cervical atlas. Uma agulha siliconizada, com calibre de 27G conectada a uma seringa de 1mL foi inserida verticalmente, centralmente e pouco profundamente na superfície. Uma leve aspiração é suficiente para com que aproximadamente 40µl de LCR flua através do dispositivo. O LCR coletado foi utilizado para quantificação de NO e contagem de parasitas. Amostras de LCR contaminadas com quaisquer quantidades de sangue foram descartadas.

3.9. Quantificação indireta de Óxido Nítrico:

A quantificação de óxido nítrico foi realizada de acordo com a Reação de Greiss, através da quantificação total de nitrito/nitrato (NO₂-/NO₃-), como

previamente descrito por Filipin e colaboradores (2011). Os níveis totais de NO_2^- que foram convertidos de NO_3^- foram determinados em amostras de LCR e soro. O NO_3^- foi convertido em NO_2^- por incubação de 0,01 mL de nitrato redutase (*Aspergillus*) e 0,01 mL de NADPH (1 mM), durante 30 min a 37°C. Os níveis NO_2^- foram determinados através da leitura em espectrofotômetro a 540 nm, após a adição dos reagentes de Griess, ou seja, 50 µL de sulfanilamida 1% (Sigma) e 50 µL de N-1-naftiletilenodiamina 0,1% (Sigma), por um período de incubação de 10 min cada, diluídos em solução de ácido fosfórico 5 %. Até o dia da realização da quantificação, as amostras foram armazenadas em Freezer 80°C (FILIPIN *et al.*, 2011).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.11. Análise estatística

Os resultados a seguir foram expressos pela comparação da média $\pm$ o erro padrão da média (SEM). Para a análise estatística, o valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. As diferenças entre os grupos foram determinadas pelas análises de One-Way ANOVA ou Two-Way ANOVA seguidos de pós-teste de Bonferroni. A escolha dos testes foi feita de acordo com o número de grupos e variáveis, em cada experimento. O software de escolha para as análises estatísticas foi GraphPad® Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

4.1) Curva parasitêmica após infecção por *T. cruzi*.

Após o inóculo com 1×10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foi avaliado o perfil da curva parasitêmica nos animais infectados e tratados com OT e nos animais infectados que receberam salina isotônica (figura 4). Não foram detectadas diferenças significativas entre os níveis parasitêmicos dos animais tratados e não tratados com OT. Para a análise dos demais dados, considerou-se o nono dia após a infecção, em acordo com resultados de parasitemia apresentados em outros experimentos do nosso grupo (BRAZÃO *et al*, 2015). Todos os animais infectados sobreviveram à infecção.

Figura 4. Curva Parasitêmica: Número de tripomastigotas sanguíneas durante 15 dias pós-infecção em ratos Wistar machos infectados com a 1×10^5 formas da cepa Y de *T. cruzi* nos seguintes grupos: Tratados com OT e Tratados com solução salina isotônica. Foram utilizados 3 animais por grupo

4.2. Efeito da desidratação sobre a osmolalidade.

A alteração da osmolalidade foi induzida para análise da qualidade de resposta do eixo Hipotálamo-neurohipofisário, por ser um estímulo para a secreção dos hormônios AVP e OT (TAZINAFO, 2014). Foi possível notar que a desidratação é importante causa da alteração da osmolalidade, com aumento significativo entre os animais desidratados. Estes resultados ainda apontam que durante a fase aguda, o nível deste estímulo independe da infecção (figura 5).

Figura 5. Efeito da desidratação sobre a osmolalidade em animais controles e infectados: Foram utilizados 300uL de plasma por amostra para a quantificação da osmolalidade plasmática por abaixamento da temperatura de congelamento. Resultados descritos em Média + ou – Erro padrão da média. Controle Hidratado (Mean: 295,500; SEM: 1,102; N=4); Infectado Hidratado (Média: 291,000; SEM: 2,38; N=4); Controle Desidratado (Mean: 323,5; SEM: 3,279; N=4); Infectado Desidratado (Mean: 321,5; SEM:3,014; N=4; *p<0,05 vs Hidratado).

4.3. Efeito do estímulo osmótico sobre a secreção de AVP.

A análise das concentrações plasmáticas de AVP demonstrou um aumento na secreção do hormônio em resposta à desidratação, tanto nos animais infectados quanto nos animais do grupo controle, sem diferença estatística entre os mesmos. Porém, Na ausência deste estímulo (animais Hidratados), a redução da AVP periférica na fase aguda da doença é estatisticamente significativa (figura 6). As concentrações hormonais de AVP foram determinadas por radioimunoensaio.

Figura 6. Secreção de AVP após desafio osmótico: comparação da alteração na secreção do hormônio vasopressina (pg/mL) frente ao estímulo osmótico, nos animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* por RIE. Controle Hidratado (Mean: 12,011; SEM: 0,451; N=4); Infectado Hidratado (Média: 4,887; SEM: 0,855; N=4); Controle Desidratado (Mean: 21,949; SEM: 0,984; N=5); Infectado Desidratado (Mean: 23,071; SEM: 3,636; N=4; *p<0,05 vs Controle; †p<0,05 vs Hidratado).

4.4. Alterações na secreção de ocitocina após desidratação

A figura 7 Apresenta os resultados da investigação sobre a qualidade da resposta frente ao estímulo osmótico induzido, com a secreção de OT. Os animais desidratados, tanto controle como infectados, apresentaram um aumento significativo da concentração do hormônio, porém os animais não submetidos ao estímulo osmótico apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de OT entre os animais Infectados. Na comparação entre os animais hidratados e desidratados observou-se uma diferença significativa entre eles.

Figura 7. Secreção de OT após desafio osmótico: comparação da alteração na secreção do hormônio ocitocina (pg/mL) frente ao estímulo osmótico, nos animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* por RIE. Controle Hidratado (Mean: 7,488; SEM: 0,130; N=4); Infectado Hidratado (Média: 4,095; SEM: 0,382; N=4); Controle Desidratado (Mean: 17,4292; SEM: 0,321; N=4); Infectado Desidratado (Mean: 18,428; SEM: 2,837; N=4; *p<0,05 vs Controle; †p<0,05 vs Hidratado).

4.5. Efeito do tratamento com ocitocina sobre a produção de óxido nítrico

No 9º dia após a infecção, observamos a concentração de NO no soro dos animais infectados e sadios (Figura 8). A infecção causou um aumento estatisticamente significativo na secreção do mediador inflamatório quando comparados aos controles, sendo que as concentrações de NO nos animais tratados com OT foram estatisticamente mais elevadas nos animais infectados em comparação com os animais que receberam injeção de salina. Dessa forma, é possível concluir que este hormônio influencia a secreção deste gás, tanto nos animais sadios, como animais infectados.

Figura 8. Concentração de óxido nítrico no soro: comparação da alteração na secreção do mediador inflamatório Óxido Nítrico (μM) frente ao tratamento por ocitocina, nos animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, pelo método de Griess. Controle Salina (Média: $23,008 \pm 3,197434$); Controle Ocitocina (Média: 49,424; SEM: 5,373708); Infectado Salina (Média: 90,344; SEM: 10,81141); Infectado Tratado (Média: 151,434; SEM: 7,451059). *: $P < 0,05$ vs Controle; †: $p < 0,05$ vs Salina; N=4.

4.6. Concentração de óxido nítrico no LCR

O LCR banha os núcleos hipotalâmicos PVN e SON, sintetizadores dos hormônios AVP e OT. As amostras coletadas do LCR foram separadas para a quantificação indireta de NO. Foi observado o aumento nas concentrações de NO presente no LCR nos animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi* quando comparados aos animais controles não infectados (Figura 9).

Figura 9. Concentração de óxido nítrico no líquido cefalorraquidiano: comparação da alteração na secreção do mediador inflamatório Óxido Nítrico (μM) frente ao tratamento por ocitocina, nos animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, pelo método de Griess. Controle (Mean: 11,9; SEM: 0,46; N=6); Infectado (Média: 67,43; SEM: 2,993 N=5); * $p < 0,05$ vs Controle.

4.7. População CD11b/c⁺ CD11b⁺ e frequência dos marcadores CD80, CD86 e RT1B no baço.

Conforme a estratégia de *gating* apresentada na Figura 10-A, investigamos a população de linhagem mielóide CD11b/c⁺CD11b⁺ (Figura 10-B), além do marcador de ativação de células apresentadoras de antígeno (APC) MHC-II⁺ (RT1B) (Figura 10-C) e os cofatores de ativação de APC CD80⁺ (Figura 10-D) e CD86⁺ (Figura 10-E). Os resultados apontaram uma redução na frequência de células CD11b⁺CD11bc⁺ após o tratamento com OT durante a infecção aguda da doença, podendo indicar um efeito de ativação, pró-migratório ou pró-apoptótico desta população de células do sistema imune (Figura 10-B). Porém, a expressão de MHC-II (RT1B) se mostra induzida no quadro de interação dos fatores Infecção e Tratamento, sugerindo uma ação de ativação das células CD11b⁺CD11bc⁺ pela OT, nessa população celular do baço (figura 10-C). Quando investigamos os cofatores de ativação CD80 e CD86, podemos notar que o tratamento não é causa de alterações nestes marcadores, sendo interessante notar que apenas o marcador CD80 apresentou aumento após a Infecção por *T. cruzi* (figura 10 D-E).

Figura 10. Imunofenotipagem de leucócitos do baço: células CD11b/c⁺ CD11b⁺. Frequência dos marcadores CD11b, CD80, CD86 e RT1B em células CD11b/c⁺. O baço foi coletado no nono dia após o inóculo com 1×10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O órgão foi macerado para suspensão das células que serão marcadas com anticorpos de interesse. **A)** Estratégia de *gate*. **B)** Frequência de leucócitos CD11b/c⁺ CD11b⁺: Salina Controle (Mean: 4,050; SEM: 0,533; N=4); Salina Infectado (Média: 4,175; SEM: 0,606; N=4); Ociticina Controle (Mean: 4,450; SEM: 0,359; N=4); Ociticina Infectado (Mean: 2,750; SEM: 0,065; N=4; * $p < 0,05$ vs Salina). **C)** Frequência do marcador RT1B, nas células CD11b/c⁺ CD11b⁺: Salina Controle (Mean: 64,150; SEM: 3,98173; N=4); Salina Infectado (Média: 60,275; SEM: 4,51246; N=4); Ociticina Controle (Mean: 65,200; SEM: 1,315928; N=4); Ociticina Infectado (Mean: 79,250; SEM: 3,447; N=4; * $p < 0,05$ vs Controle). **D)** Frequência do marcador CD80, nas células CD11b/c⁺ CD11b⁺: Salina Controle (Mean: 64,025; SEM: 3,08; N=4); Salina Infectado (Média: 78,650; SEM: 5,810; N=4); Ociticina Controle (Mean: 64,150; SEM: 6,036; N=4); Ociticina Infectado (Mean: 82,925; SEM: 0,278; N=4; * $p < 0,05$ vs Controle).. **E)** Frequência do marcador CD86, nas células CD11b/c⁺ CD11b⁺: Salina Controle (Mean: 89,675; SEM: 2,786; N=4); Salina Infectado (Média: 91,975; SEM: 2,526; N=4); Ociticina Controle (Mean: 90,925; SEM: 2,447; N=4); Ociticina Infectado (Mean: 91,675; SEM: 2,343; N=4).

A

B

C

D

E

4.8. Frequência de marcadores em células CD11B/C⁺ / CD11b⁻.

Na mesma população, foi investigado a frequência do marcador CD11b/c em células CD11b⁻, conforme estratégia de gating apresentada na figura 11-A. Também foram analisados os marcadores MHC-II (RT1B) (Figura 11-C) e os cofatores de ativação CD80⁺ (Figura 11-D) e CD86⁺ (Figura 11-E). Os resultados apontam que, nesta fase da infecção por *T. cruzi*, a população celular CD11B/C⁺CD11b⁻ não apresenta alterações significativas nos marcadores CD80, CD86 e RT1B, e que o tratamento por OT não causa efeitos na ativação destas células.

Figura 11. Imunofenotipagem de leucócitos do baço: células CD11b/c⁺ CD11b⁻. Frequência dos marcadores CD80, CD86 e RT1B em células CD11b/c⁺. **A)** Estratégia de *gate*. **B)** Frequência de leucócitos CD11b/c⁺ CD11b⁻: Salina Controle (Mean: 64,375; SEM: 4,147; N=4); Salina Infectado (Média: 57,075; SEM: 2,247; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 66,300; SEM: 2,024; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 65,100; SEM: 3,023; N=4). **C)** Frequência do marcador RT1B, nas células CD11b/c⁺ CD11b⁻: Salina Controle (Mean: 6,267; SEM: 1,017; N=3); Salina Infectado (Média: 6,225; SEM: 0,709; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 7,625; SEM: 0,364; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 8,533; SEM: 1,378; N=3). **D)** Frequência do marcador CD80, nas células CD11b/c⁺ CD11b⁻: Salina Controle (Mean: 19,150; SEM: 2,179; N=4); Salina Infectado (Média: 22,375; SEM: 1,082; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 21,625; SEM: 1,134; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 22,525; SEM: 2,889; N=4). **E)** Frequência do marcador CD86, nas células CD11b/c⁺ CD11b⁻: Salina Controle (Mean: 13,050; SEM: 1,085; N=4); Salina Infectado (Média: 11,225; SEM: 1,07; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 12,175; SEM: 0,761; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 13,650; SEM: 1,965; N=4).

A

B

C

D

E

4.9. Efeito da OT sobre a população CD3⁺/CD8⁺ e CD3⁺/CD4⁺ no Baço.

Em sequência, foi realizada a análise das populações celulares CD3⁺CD4⁺ (Linfócitos T-CD4) e CD3⁺CD8⁺ (Linfócitos T-CD8), no baço dos animais no 9º dia pós infecção. Quando considerado apenas o fator Infecção, não foram identificadas alterações significativas na frequência destas populações. Porém, os resultados apontam para uma possível interação dentre os fatores Infecção e Tratamento causando a redução da população CD3⁺CD8⁺ e o aumento da população CD3⁺CD4⁺ (figura 12 B e C, respectivamente).

Figura 12: Imunofenotipagem de leucócitos do baço: células CD3⁺: Frequência dos marcadores CD4 e CD8 em células CD3⁺. **A)** Estratégia de *gate*. **B)** Frequência de leucócitos CD3⁺ CD8⁺: Salina Controle (Mean: 67,025; SEM: 2,639; N=4); Salina Infectado (Média: 63,775; SEM: 1,035; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 63,4; SEM: 0,94; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 58,375; SEM: 0,399; N=4; *p<0,05 vs Salina; †p<0,05 vs Controle). **C)** Frequência de leucócitos CD3⁺CD4⁺: Salina Controle (Mean: 18,275; SEM: 1,802; N=4); Salina Infectado (Média: 22,475; SEM: 0,815; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 23,400; SEM: 0,965; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 26,400; SEM: 1,135; N=4; *p<0,05 vs Salina; †p<0,05 vs Controle).

A

B

C

4.10. Alteração na subpopulação de macrófagos após tratamento com OT

Foi avaliado, nas populações celulares do baço, a frequência de macrófagos em animais infectados e controles tratados com OT ou salina isotônica (figura 13). A análise dos dados revelou uma queda significativa tanto nos animais submetidos ao tratamento com OT como com salina isotônica, levando à conclusão de que a diminuição significativa da população de macrófagos no baço é independente do tratamento com OT.

Figura 13. Imunofenotipagem de leucócitos do baço: Macrófagos. Frequência de macrófagos esplênicos de animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, tratados com OT e salina isotônica. A) Estratégia de gate. B) Frequência de Macrófagos: Salina Controle (Mean: 2,3906; SEM: 0,101; N=5) Ociticina Controle (Mean: 2,3396; SEM: 0,111; N=5) Salina Infectado (Mean: 1,936; SEM: 0,057; N=5; * $p < 0,05$ vs Controle); Ociticina Infectado (Mean: 1,9498; SEM: 0,060; N=5; * $p < 0,05$ vs Controle).

A)

B)

4.11. Efeito do tratamento com OT sobre as concentrações séricas de IL1- β

A IL1- β é uma citocina pró-inflamatória de fase aguda, com funções no recrutamento de células do sistema imune (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). A avaliação da concentração sérica de IL1- β (figura 14) mostrou que tanto a infecção como o tratamento por OT não induzem alterações significantes desta citocina.

Figura 14. Concentração de IL1- β : Concentração sérica da citocina pró-inflamatória IL1- β em pg/mL nos animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* através do método de ELISA, 9 dias após o inoculo infectante. Os resultados foram descritos em Média +ou- Erro padrão da média. Salina-Controle (Mean: 28,65; SEM:1,043; N=4); Salina Infectado (Mean: 29,4; SEM: 0,822; N=4); Ocitocina-Controle (Mean: 29,475; SEM: 0,629; N=4); Ocitocina Tratado (Mean; 27,825; SEM: 0,448; N=4).

4.12. Efeito do tratamento com OT sobre a concentração sérica de IL-2.

Em seguida, foi analisada a concentração de IL-2, que é uma citocina importante para a ativação e proliferação de Linfócitos-T (SARAH; LIU, 2004; MAES *et al*, 2012). As análises foram possíveis usando técnica de ELISA, revelando que ocorreu um aumento significativo nas concentrações séricas de IL-2 nos animais Infectados e Tratados com a OT, sugerindo um efeito positivo da OT na secreção deste mediador, durante a fase aguda da doença (figura 15).

Figura 15. Concentração de IL-2: concentração sérica da interleucina IL-2 em animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* tratados com OT e salina isotônica através do método de ELISA, 9 dias após o inoculo infectante. Salina Controle (Mean: 37,487; SEM: 2,089; N=4); Salina Infectado (Média: 36,227; SEM: 1,615; N=4); Ociticina Controle (Mean: 32,51; SEM: 1,217; N=4); Ociticina Infectado (Mean: 44,748; SEM: 1,552; N=3; *p<0,05 vs Controle).

4.13. Efeito do tratamento com OT sobre a concentração sérica de IL-4

Para auxiliar a compreender o papel da OT no perfil imunológico da fase aguda da doença de Chagas, diferentes citocinas pró e anti-inflamatórias foram avaliadas. É possível analisar o efeito do tratamento de OT sobre a concentração de IL-4 no soro dos animais Infectados e animais do grupo Controle tratados e não tratados com OT. Não houveram alterações significativas na concentração de IL-4, no nono dia após a inoculação de *T. cruzi* (figura 16).

Figura 16. Concentração de IL-4: Concentração sérica da interleucina IL-4 em animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* tratados com OT ou salina isotônica através do método de ELISA, 9 dias após o inoculo infectante. Salina-Controle (Mean: 4,375; SEM: 0,11; N=4); Salina Infectado (Mean: 4,05; SEM= 0,155; N=4); Ocitocina-Controle (Mean: 4,725; SEM: 0,149; N=4); Ocitocina-Infectado (Mean: 4,7; 0,216; N=4).

4.14. Efeito do tratamento com OT sobre a concentração sérica de IL-6

A IL-6 tem atividade pleiotrópica, atuando no recrutamento e ativação de linfócitos e monócitos, ao tempo que regula a produção de mediadores inflamatórios como a IL-1 β e o NO. No nono dia após o inóculo, a IL-2 apenas apresentou alterações de sua concentração nos animais tratados com a OT, apresentando um aumento estatístico (figura 17).

Figura 17. Concentração de IL-6: Concentração em pg/ml da Interleucina 6 (IL-6) para os grupos controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* tratados e não tratados com OT. Utilizou-se 50ul de soro e a quantificação através do método de ELISA. Salina Controle (Mean: 106,206; SEM: 2,16; N=4); Salina Infectado (Média: 107,789; SEM: 6,062; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 113,361; SEM: 1,373; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 137,994; SEM: 7,808; N=4; *p<0,05 vs Controle)

4.15. Efeito do tratamento com OT sobre a concentração sérica de IL 10

A IL-10 é uma citocina de perfil anti-inflamatório, atuando na inibição de algumas citocinas de perfil T helper 1 (Th1) e na ativação de macrófagos (OPP, 1995). O efeito da OT sobre esta citocina foi investigado pelo método de ELISA. Em nossos experimentos, a IL-10 não apresentou alterações, nesta fase da doença. Os resultados sugerem, ainda, que a IL-10 não é estimulada pelo tratamento com OT (figura 18).

Figura 18. Concentração de IL-10: Representa as concentrações séricas de IL-10 em animais controles e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* tratados e não tratados com OT. Utilizou-se 50µl de soro e realizada através do método de ELISA.. Os resultados foram descritos em Média +ou- Erro padrão da média. Salina-Controle (Mean: 119,553; SEM: 7,276; N= 3); Salina-Infectado (mean: 114,146; SEM: 1,121; N=4); Ocitocina Controle (Mean: 108,598; SEM: 1,887; N=4) ; Ocitocina Infectado (Mean: 120,092; SEM: 0,997; N=4)

4.16. Efeito do tratamento com OT sobre a concentração sérica de TNF- α

Na fase aguda da doença de Chagas, o reconhecimento do parasito pelas células do sistema imune induz a produção de IFN- γ e TNF- α , considerado como uma das primeiras etapas da resposta ao *T. cruzi* (VESPA *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1995; BRAZÃO *et al.*, 2009). Os animais infectados foram tratados com OT para a avaliação das concentrações do marcador inflamatório TNF- α (Figura 19). Aparentemente, o tratamento com OT não é fator nas alterações da concentração desta citocina, porém a infecção por *T. cruzi* ocasionou um aumento significativo deste mediador.

Figura 19. Concentração de TNF- α : Concentrações séricas em pg/mL de TNF- α em animais do grupo controle e infectados com a cepa Y de *T. cruzi* 9 dias após o inoculo infectante. A dosagem de TNF- α foi realizada em amostra de soro (50uL), nos animais infectados pelo *T. cruzi*, através do método de ELISA. Os resultados foram descritos em Média +ou- Erro padrão da média. **Salina-Controle** (Mean: 64,615; SEM: 23,787; N=4); **Salina-Infectado** (Mean: 234,808; SEM: 39,920; N=4; *p<0,05 vs Controle); **Ocitocina-Controle** (Mean: 38,654; SEM: 12,301; N=4); **Ocitocina-Infectado** (Mean: 259,808; SEM: 19,947; N=4; *p<0,05 vs Controle)

4.17. Efeito do tratamento com OT sobre a concentração sérica de INF- γ

Após nove dias do inóculo, a amostra de soro foi coletada para a dosagem de INF- γ . A infecção por *T. cruzi* causou alterações neste mediador inflamatório. Porém, os animais tratados com OT não apresentaram alterações neste mediador, em relação aos animais tratados com salina (figura 20).

Figura 20. Concentração de INF- γ : Concentrações séricas em pg/ml de INF- γ em animais do grupo controle e infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, 9 dias após o inoculo infectante. Os resultados foram descritos em Média $\pm$ Erro padrão da média. Salina-Controle (Mean: 44,04; SEM: 1,258; N=4); Salina infectado (Mean: 85,315; SEM: 13,541; N=4; **p=0,057**); Ocitocina-Controle (Mean: 51,34; SEM: 2,875; N=4); Ocitocina Infectado (Mean: 87,395; SEM: 1,247; N=4; *p<0,05 vs Controle)

DISCUSSÃO

A cepa Y de *T. cruzi* é uma das mais utilizadas nas pesquisas científicas da DC. No modelo experimental com ratos Wistars, utilizado neste projeto de pesquisa, esta cepa não provoca mortalidade com o inóculo infectante utilizado, porém garante a infecção sistêmica por *T. cruzi*. Esta cepa foi isolada pela primeira vez em 1953 e desde então é mantida em modelo murino. (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953; BRAZÃO *et al.*, 2015; COLATO *et al.*, 2017). Baseado em projetos anteriormente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, escolhemos o nono dia após o inóculo como dia experimental, durante a fase aguda da infecção (BRAZÃO *et al.*, 2015; COLATO *et al.*, 2017).). Esta fase é caracterizada pela maior taxa de divisão celular por amastigotas dentro das células que fagocitaram o parasita gerando os tripomastigotas sanguícolas que rompem a célula ganhando a corrente circulatória.

A doença de Chagas é uma doença complexa que envolve vários fatores como sociais, educacionais, epidemiológicos, virulência da cepa e resposta imune do hospedeiro. A união destes fatores pode resultar nos diferentes quadros clínicos da doença, desde a vida assintomática, até a cardiomiopatia aguda potencialmente fatal (CLAYTON, 2010; MEYMANDI *et al.*, 2018; ORTIZ *et al.*, 2019). Em nossos experimentos, verificamos alguns aspectos imunoendócrinos da doença de Chagas na fase aguda, em ratos Wistar machos adultos. Ao longo deste trabalho, os animais foram infectados com uma quantidade de 100000 formas de *T. cruzi*. Estes animais foram acompanhados ao longo dos dias e todos sobreviveram à infecção.

A resposta inflamatória ao estímulo infeccioso é um processo complexo, no qual atuam vários fatores imunológicos e endócrinos do organismo, com a função de restabelecer a atividade regular dos diferentes órgãos. O dado mais importante deste trabalho foi uma redução estatisticamente significativa nas concentrações de OT durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*.

Alguns trabalhos demonstram que os receptores de OT podem estar presentes em inúmeros tecidos, incluindo rins, ovários, testículos, hipófise, cardiomiócitos, endotélio vascular, adipócitos e células T regulatórias (GIMPL; FAHRENHOLZ; 2001). Outras pesquisas reconhecem a OT como um hormônio cardiovascular com efeitos cardioprotetores, sendo sintetizada no coração humano e de ratos (JANKOWSKI *et al.*, 1998; GUTKOWSKA *et al.*, 1997; JANKOWSKI *et al.*, 2004; GUTKOWSKA *et al.*, 2011), exercendo função cardioprotetora diretamente ou via estimulação de mediadores tais como os peptídeos natriuréticos (GUTKOWSKA *et al.*, 1997; GUTKOWSKA *et al.*, 2000) e óxido nítrico (DANALACHE *et al.*, 2007).

Os efeitos cardiovasculares da OT incluem a natriurese, diminuição da pressão arterial e vasodilatação induzida por NO. O sistema OT no coração regula a sobrevivência das células cardíacas e confere proteção contra a injúria isquêmica (JANKOWSKI *et al.*, 2010; GONZALEZ-REYES *et al.*, 2015). Dessa forma, os baixos níveis de OT encontrados nos animais infectados corroboram indiretamente com os dados apresentado nos trabalhos anteriormente citados, onde a diminuição das concentrações desse hormônio poderia prejudicar a estrutura celular cardíaca e consequentemente sua função nos animais infectados. Neste projeto, avaliamos ainda a secreção de AVP no plasma, por RIE durante a fase aguda da infecção experimental. Houve uma redução das concentrações de AVP com comportamento semelhante ao da OT.

Inicialmente, nossa hipótese para a alteração da OT era de que o NO poderia estar sendo produzido no hipotálamo, através da ativação de iNOS centralmente. Essa hipótese é embasada em artigos publicados nos últimos anos sobre processos inflamatórios sistêmicos mais graves que a DC, como a sepse (OLIVEIRA-PELLEGRIN *et al.*, 2013). Esses trabalhos demonstram que, durante o processo inflamatório sistêmico, a iNOS se torna ativada no hipotálamo, regulando negativamente a produção hormonal e afetando as funções fisiológicas dos hormônios AVP e OT (OLIVEIRA-PELLEGRIN *et al.*, 2013; STABILE *et al.*, 2016; SANTOS-JUNIOR *et al.*, 2017). Corroborando com essa hipótese, nossos resultados mostram um grande aumento na produção de NO no soro e no LCR, sinalizando que, na circulação periférica, e possivelmente no SNC, a iNOS pode estar induzida nessa fase da DC.

Outras hipóteses para ajudar a compreender a redução da secreção dos hormônios neurohipofisários foram formuladas: 1) o aumento de glicocorticoides, atribuídos à fase aguda da doença e a possível invasão tecidual das adrenais (CORRÊA-DE-SANTANA *et al.*, 2006; DUTRA *et al.*, 2014); 2) presença direta do parasita no SNC, através do atravessamento da Barreira Hematoencefálica e posteriormente invasão do tecido neural (PAGANO *et al.*, 1999; DA MATA *et al.*, 2000; PITTELLA, 2009); 3) acesso do parasito ao SNC, pelo LCR (PITTELLA, 2009). Dentre as alternativas apresentadas anteriormente nosso trabalho investigou apenas a presença de *T. cruzi* no LCR dos animais infectados através de microscopia ótica comum, não foi detectado parasitas na fase aguda da doença, provavelmente devido

às características genéticas de resistência natural à *T. cruzi* apresentadas pela linhagem de ratos *Wistar*.

Para melhor compreender a função da OT na resposta imunológica, animais infectados e sadios foram tratados com uma dose injetável subcutânea de 3UI/kg (do animal) de OT. Os animais dos grupos controle foram tratados com salina isotônica em mesmo volume e via. Após a infecção intraperitoneal, foram realizadas duas curvas parasitêmicas, onde foi calculado o número de tripomastigotas sanguíneas em animais tratados e não tratados com OT. A contagem de tripomastigotas sanguíneas em ambos os grupos de animais foram semelhantes e sem significância estatística, confirmando os dados apresentados em projetos anteriores, de nosso grupo de pesquisa (BRAZÃO *et al.*, 2017). A interpretação desses dados nos leva a conclusão de que o hormônio ocitocina não contribuiu para a diminuição da parasitemia sanguínea nesta fase da doença.

Neste projeto, foram investigados os efeitos da OT na fase aguda da DC, com o foco na compreensão da sua importância na resposta imune, nessa fase, e tentar entender os possíveis efeitos de sua redução. A OT regula negativamente o rolamento de leucócitos para o tecido cardíaco enquanto estimula a produção de NO, auxiliando na restauração da pressão sanguínea e tônus dos vasos sanguíneos. Por estas características, a OT é utilizada em tratamento para prevenção da isquemia cardíaca em quadros de cardiomiopatia aguda (FAGHIHI *et al.*, 2012; ELORZA-ÁVILA *et al.*, 2016).

O processo inflamatório envolve alterações na secreção hormonal, maturação e migração de leucócitos, no sistema circulatório e produção de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. O NO age sobre o metabolismo do patógeno, causando estresse oxidativo e a morte do parasito (KIRKEBOEN; STRAND, 1999).

Na fase aguda da doença, a sinalização para a produção de IFN- γ e TNF- α é considerada uma das primeiras etapas da resposta do organismo ao parasito, com ação na ativação de macrófagos e a consequente produção de NO (VESPA *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1995; BRAZÃO *et al.*, 2009). Os resultados apresentados mostram que a OT afeta positivamente a produção de NO, além disso, ao avaliarmos citocinas pró-inflamatórias de fase aguda, verificamos o aumento de IFN- γ e o TNF- α nos animais infectados, resultados esses que corroboram vários trabalhos publicados anteriormente (BRAZÃO *et al.*, 2009; PEREZ *et al.*, 2011). É interessante notar que apesar do aumento do mediador inflamatório NO, as citocinas IFN- γ e o

TNF- α , que são pró-estimuladoras da produção de NO, não são afetadas pela OT. Esses resultados sugerem um efeito pró-inflamatório da OT, estimulando o aumento da NO no soro, independente de algumas citocinas pró-inflamatórias.

A IL-6 é uma importante citocina inflamatória de atividade pleiotrópica, agindo positivamente na maturação e proliferação de células do sistema imune, enquanto atua na proteção tecidual inibindo a migração de macrófagos para o tecido, o aumento de IL-1 β e a produção excessiva de NO (SANMARCO *et al.*, 2017). Vários trabalhos mostram que a IL-6 é produzida pelos cardiomiócitos, e contribui para a sobrevivência destes, no hospedeiro infectado por *T. cruzi* (PONCE *et al.*, 2011; PONCE *et al.*, 2013). Camundongos deficientes de IL-6 sucumbem à infecção por *T. cruzi* (GAO; PEREIRA, 2002; AROCENA *et al.*, 2014), o que sugere que a resposta imune inata é dependente de IL-6, mediando a sobrevivência do hospedeiro após a infecção pelo parasito (SANMARCO, 2017).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória de fase aguda, com funções no recrutamento de células do sistema imune (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). A ação inibitória da IL-6 sobre a IL-1 β reflete os mecanismos de autorregulação do sistema imunológico, evitando uma resposta exacerbada com potencial nocivo aos diferentes tecidos do organismo. Na tentativa de verificar uma possível interação destas citocinas após o tratamento com OT, verificamos que a IL-1 β , nove dias após o inóculo infectante por *T. cruzi*, não apresentou alterações significativas nem interações com o aumento da OT. Contudo, a IL-6 apresenta grande interação no grupo infectado + tratamento. Considerando o efeito positivo da OT para a secreção de NO, seria possível sugerir que o aumento da IL-6 deveria acompanhar o aumento deste mediador. Todavia, uma vez que o animal infectado, tratado com salina isotônica, não apresenta esta alteração, esta hipótese não se fundamenta. Portanto, o aumento de IL-6 aparenta ser devido ao tratamento com OT, diretamente.

A IL-2 é uma citocina importante para a ativação e a proliferação de diferentes populações de Linfócitos-T. Desta forma, sua ativação leva a evolução da resposta imunológica, com a maturação e a proliferação de Linfócitos-T, tanto T-helper-1 (Th1), quanto T-helper-2 (Th2). O tratamento com 3UI/kg de OT, foi capaz de aumentar a IL-2 no animal infectado, resultado de uma interação da infecção e tratamento.

IL-10 pode ser considerada uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias produzida por macrófagos e linfócitos-T reguladores. Esta citocina inibe a produção de IFN- γ por linfócitos-T, bem como a produção de várias outras citocinas

e quimiocinas por macrófagos (TRIANCHIERI, 2007). Altos níveis de IL-10 tem sido detectados em cultura de células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* e alguns autores consideram a síntese de IL-10 como um mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro. (WILLE *et al.*, 2001). Nesse projeto de pesquisa, o tratamento com a OT não causou alterações significantes nas concentrações desse mediador. A IL-4 é uma citocina produzida por células Th2, basófilos, mastócitos e eosinófilos ativados. Age como anti-inflamatório, bloqueando a síntese de IL-1, TNF- α , IL-6 e macrófagos. Entre outras funções, promove a diferenciação de linfócitos Th2, a proliferação e diferenciação de linfócitos B e é um potente inibidor da apoptose (SARAH e LIU, 2004; MAES *et al.*, 2012). Na fase aguda da DC, nossos experimentos não detectaram alterações nessas citocinas, apresentando níveis basais, nos animais infectados.

Estes resultados mostram que na DC a OT possui um efeito imunológico pró-inflamatório, com ativação da IL-2, aparentemente colaborando para a maturação de células-T. Averiguamos, também, a citocina pró-inflamatória IL-17 (dados não demonstrados), o tratamento com OT não mostrou efeitos positivos ou negativos nesta fase da doença.

Em conjunto, os resultados apresentados revelam a participação da OT no aumento da concentração de citocinas no soro dos animais infectados com *T. cruzi*. É possível sugerir que a OT auxilia na ativação de células do sistema imune, em especial os Linfócitos-T, através do aumento de IL-2 e IL-6, enquanto colabora com a mudança de perfil imunológico do organismo, com o aumento de IL-6 no soro.

Para ajudar a compreender os parâmetros neuroimunoendócrinos da DC, o baço de animais infectados foi coletado e o macerado desta amostra foi utilizado para a pesquisa do fenótipo celular, comparando diferentes populações celulares entre os animais tratados com OT e animais não tratados. Neste experimento, por citometria de fluxo, nós pesquisamos nas populações de células da linhagem mielóide (CD11b⁺CD11bc⁺ e CD11b⁻CD11bc⁺), os marcadores coestimulatórios CD80 e CD86, e o marcador de ativação RT1B. Também pesquisamos a marcação de macrófagos (Macrophage Subset), Linfócitos T-CD4 (CD3⁺/CD4⁺) e Linfócitos T-CD8 (CD3⁺/CD4⁺).

A resposta imunológica apresenta grande complexidade frente as alterações hormonais que ocorrem durante o processo inflamatório. Nossos resultados de citometria de fluxo mostram a diminuição da população de linhagem mielóide CD11bc⁺CD11b⁺, nesta fase da doença. Estes resultados sozinhos criam várias

hipóteses. A citometria de fluxo foi feita sobre uma concentração determinada de células, após a maceração do tecido. Isto pode indicar, que a marcação CD11b^{c+}CD11b⁺ diminuída nos animais infectados e tratados pode ser decorrente de: 1) redução, por apoptose, da população de células da linhagem mielóide, induzida pelo aumento da OT; 2) A migração celular; 3) O aumento de populações não CD11b⁺.

De acordo com o trabalho de Miyahira et al., 2003, foi demonstrado que os ligantes CD80 e CD86 possuem um papel importante na resposta imune contra *T. cruzi* e a depleção tanto de CD80 como CD86 em camundongos selvagens apresentavam uma exacerbação da doença evidenciado por parasitemia constante e mortalidade elevada (MIYAHIRA et al., 2003). Para investigar o perfil das células CD11b⁺ presentes no baço, marcamos a expressão de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86. Verificamos que estes marcadores não apresentaram interações com o tratamento de OT, embora haja o aumento do marcador CD86, nos animais infectados. Porém, o marcador de ativação celular RT1B (MHC-II), demonstrou interação com o tratamento, nos animais infectados. Este resultado sugere que a OT no baço tem efeito benéfico para ativação celular, e conseqüentemente para a resposta imunológica. Esse último dado indiretamente corrobora com as afirmações de Miyahira et al., (2003).

O *T. cruzi* é capaz de se evadir da resposta imune, invadindo o citosol de macrófagos após escapar do vacúolo parasitóforo, onde então se multiplica (ANDREWS, 1990). A porcentagem de frequência dos macrófagos através da citometria de fluxo encontrava-se diminuída, independente do tratamento com OT. As células CD11b^{c+} CD11b⁻ em ratos sugere células dendríticas, são fundamentais na sinalização da resposta imune, com papel importante na apresentação de antígenos. Nesta fase da resposta imune, nem a infecção, nem o tratamento foram capazes de aumentar os marcadores moleculares referentes à presença e à ativação destas células.

Por fim, células da linhagem linfóide foram investigadas para os marcadores CD4 (células auxiliares) e CD8 (células citotóxicas). Corroborando os resultados vistos com as citocinas, a ativação ou aumento da população de células CD4⁺ está potencializada, nos animais que foram tratados com a OT. É possível sugerir que a população de Células-T esteja estimulada por conta do processo infeccioso, mas,

assim como ocorre com as Citocinas IL-6 e IL-2, a OT potencializa a resposta imunológica, regulando positivamente a atividade e a presença deste fenótipo celular.

A importância desse trabalho foi a detecção de uma redução das concentrações de ocitocina durante a fase aguda da doença. Este hormônio encontra-se relacionado com a produção de Óxido Nítrico e a aparente capacidade de potencializar ou acelerar a sinalização pró-inflamatória e/ou anti-inflamatória, na fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*. Através dos nossos dados podemos aventar a hipótese de que a OT é benéfica ao organismo através da modulação de inúmeros parâmetros imunológicos, tais como a produção de IL-2, IL-6 e NO nos animais infectados, bem como a população de células CD4⁺, promovendo a ativação de células da linha mielóide (CD11b⁺/RT1b⁺). Novos experimentos devem ser conduzidos para melhor averiguar a influência da OT na resposta imune de animais infectados com *T. cruzi*.

CONCLUSÕES

O processo inflamatório da fase aguda da doença de Chagas em ratos Wistar adultos jovens é caracterizado por uma complexa interação neuroimunoendócrina com o consequente comprometimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal através da diminuição da produção de vasopressina e ocitocina.

A OT atua imunomodulando a resposta imune do hospedeiro durante a fase aguda da tripanosomíase experimental, sendo que a diminuição das concentrações de ocitocina durante essa fase pode ser decorrente de um dos inúmeros mecanismos de escape do parasita, diminuindo suas concentrações e, conseqüentemente, facilitando sua invasão no organismo do hospedeiro.

Embora sua ação nessa fase da doença não esteja completamente esclarecida, o tratamento com a OT revela novas possibilidades no estudo da fase inicial da doença de Chagas e no combate à fisiopatologia da doença.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5.ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p.308-326, 2005

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Front Immunol.** v. 24, n.9, p.1929. eCollection Aug 2018.

ALCINA, A.; FRESNO, M. Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** v. 9, n. 2, p.175-86, Mar. 1987.

ALIBERTI, J. C. *et al.* Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**, v.64, p.1961-1967, jun. 1996.

AKAMINE, M. *et al.* Interferon-gamma reverses the evasion of Birc1e/Naip5 gene mediated murine macrophage immunity by *Legionella pneumophila* mutant lacking flagellin. **Microbiol Immunol**, v. 51, n.3, p. 279-87. 2007

ANDREWS, N. W. *et al.* A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, p. 1277–1287, 1990.

ANTUNES-RODRIGUES, J. *et al.* Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169-208, Jan, 2004.

ARANTES, R.M. *et al.* Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Am J Pathol.** v. 164, n. 4, p. 1361-8, Apr, 2004.

AROCENA, A.R. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection **Eur. J. Immunol.**, v.44, p. 184-194, 2014,

BERKOWITZ, A. L. *et al.* Neurologic manifestations of the neglected tropical diseases. **J Neurol Sci.** v. 349, n. 1-2, p. 20-32, Feb, 2015.

BERN, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. v. 24, n. 4, p.655-81, 2011

BERN, C. Chagas' disease. **N Engl J Med**, p. 373:1882, 2015.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v.59, p.26-30, 2000.

DEL REY A, *et al.* Alterations in the pituitary-adrenal axis of adult mice following neonatal exposure to interleukin-1. **Brain Behav Immun.** v. 10, n 3, p. 235-48, 1996, Sep.

BESEDOVSKY, H. O., DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr Rev.** v. 17 n.1, p. 64-102, Feb, 1996.

BORGES, M. M.; et al. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, p.493-502, 1992.

BORGES, C. R. B.; et al. 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.

BRENER, Z.; et al. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.55-56, 2000.

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.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.114, p.103-110, 1997.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, p.220-224, 1963.

BRAZÃO, V., et al. *Trypanosoma cruzi*: The effects of zinc supplementation during experimental infection. **Experimental Parasitology**, v.118, p.549-554, 2008

Brazão V, et al. Effects of melatonin on thymic and oxidative stress dysfunctions during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Pineal Res.** v. 65 n. 3, Aug 1, 2018.

BRAZÃO V, et al. Interleukin-17, oxidative stress, and inflammation: role of melatonin during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Pineal Res.** v. 59 n. 4, p. 488-96, 2015 Oct 19.

BRAZÃO V, et al. Interleukin-17, oxidative stress, and inflammation: role of melatonin during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Pineal Res.** v. 59 n. 4, p. 488-96, 2015 Nov

BRAZÃO, 2017. Melatonin: Antioxidant and modulatory properties in age-related changes during *Trypanosoma cruzi* infection, **J Pineal Res.** v. 63, n. 1, Aug, 2017.

BUSTAMANTE, J.M.; et al. Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. **Parasitology Research**, v.100, p.1407-1410, 2007.

BRITO, M.M.; PIRES, M.Q.; PACHECO, R.S. Chagas disease and HIV coinfection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.2, p.1-7, 2003.

CAETANO, L.C.; et al. Influence of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in the depletion of esophageal neurons in *Calomys callosus*. **Digestive Diseases and Sciences**, v.51, p.1796-1800, 2006.

CARDILLO, F.; et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and Interleukin 10: Role of NK cells. **Infection and Immunity**, v.64, p.128-134, 1996.

CARDOSO M.S., REIS-CUNHA J. L. BARTHOLOMEU, D.C Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection, **Front Immunol.** v. 6, p. 659, 2016.

CASTAÑOS-VELES, E.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. **Infection and Immunity**, v.66, p.2960-2968, 1998.

CHAGAS, C. Nova tripanossomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade morbida para o homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, S4–S5 (2010).

COLATO RP, et al. Ageing is not associated with an altered immune response during *Trypanosoma cruzi* infection: Ageing and *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Gerontol**, v. 90, p. 43-51, 2017.

CONSIGLIO, A.R.; LUCION A.B. Technique for collecting cerebrospinal fluid in cisterna magna on non-anesthetized rats. **Brain Res protocol**, v. 5, n. 1, p.109-14., 2000.

CORREA-DE-SANTANA, E.; et al. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v.173, p.12-22, 2006.

CORRÊA-DE-SANTANA, E.; et al. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in *Trypanosoma cruzi* -infected mammosomatotrophic cells. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, p.208–212, 2009.

COUGO-PINTO, P. T. ; et al. Safety of IV thrombolysis in acute ischemic stroke related to Chagas disease. **Neurology**. V.81, n.20, p.1773-5, 2013

CSABA G. Hormones in the immune system and their possible role. A critical review. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 61 p.241–260. 2014.

CUNHA-NETO E, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope cross-reactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen, **Proc Natl Acad Sci**, vol. 92 (pg. 3541-5), 1995.

CUNHA-NETO E, et al. Autoimmunity in Chagas' disease: identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein cross-reactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient, **J Clin Invest** , vol. 98, p. 1709-12, 1996.

CUNNINGHAM, E. T.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends Neurosci [S.I.]**, v. 14, n. 9, p. 406-11, Sep 1991.

DA MATA JR, et al. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. **Brain Res Bull**, v. 53, p.153–162, 2000

DANALACHE BA, et al. Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis. **Stem Cells.** ; v. 25, n. 3, p. 679–688, 2007.

DEANE, M. P. Significance of polymorphism in *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS. **Fundação Oswaldo Cruz**, Brasil, Anais/Abstracts, p. A6-A7, 1979.

DORN. Whac-a-mole: future trends in Chagas transmission and the importance of a global perspective on disease control, **Future Microbiol**, v. 2, n. 4, p. 365-7, 2007.

DOST CK, et al. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitol Res.**; v. 88, n. 7, p. 609-16. Jul 2002

DOST, C.K.; et al. Is nitric oxide involved in the tolerance of *Calomys callosus* as a reservoir host towards *Trypanosoma cruzi* infection? **The Journal of Infection**, v.52, p.49-55, 2006.

DUNN, F. L. et al. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **J Clin Invest [S.I.]**, v. 52, n. 12, p. 3212-9, Dec 1973.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical of human chagas disease. **Trends Parasitol.** v. 21, p. 581–587, 2005.

DUTRA, W. O.; et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol.** v.36, p.377-87, 2014.

ELANDS, J. *et al.* Neurohypophyseal hormone receptors: relation to behavior. **Prog Brain Res [S.I.]**, v. 91, p. 459-64, 1992.

ELORZA-ÁVILA AR, et al. Oxytocin's role on the cardiorespiratory activity of endotoxemic rats. *Respiratory Physiology and Neurobiology* **Respir Physiol Neurobiol.** v.236, p.19-22, Feb, 2017.

ELIAS, L.L., et al. Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, p.1243–1247, 1997.

ELENKOV, I. J.; et al. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. **Neuroimmunomodulation**, v. 12, p.255–269, 2005.

ERBAS, O. *et al.* Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. **J Surg Res [S.I.]**, v. 183, n. 1, p. 313-20, Jul 2013.

ERBAS O, et al. Oxytocin inhibits pentylentetrazol-induced seizures in the rat. **Peptides**, v.40: p.141-4, Feb, 2013.

ESCOBEDO, G.; et al. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? **Trends in Parasitology**, v.12, p.588-593, 2005.

FILIPIN, Mdel. V.; et al. Prolactin: Does it exert an up-modulation of the immune response in *Trypanosoma cruzi*-infected rats? **Veterinary Parasitology**, v.181, p.139 – 145, 2011.

GAO, W; PEREIRA, M.A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol**, v.32, p. 167-170, 2002.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, v.22, p.2501-2506, 1992.

GIEFING-KROLL C, et al. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. **Aging Cell**,; v.14: p.309–321, 2015

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends in Parasitology**, v.19, p.19-22, 2003.

GIMPL G, FAHRENHOLZ F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiol Rev**. v.81 n.2, p.629–683, 2001

GIUSTI-PAIVA A, et al. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med**, v.30, p.1306–1310, 2002.

GIUSTI-PAIVA, A. *et al.* Vasopressin mediates the pressor effect of hypertonic saline solution in endotoxic shock. **SHOCK [S.I.]**, v. 27, n. 4, p. 416-21, Apr 2007.

GODFRAIND, C.; HOLMES, K.V.; COUTELIER, J.P. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. **Journal of Virology**, v.69, p.6541–6547, 1995.

GONZAGA NA, et al. Ethanol withdrawal increases oxidative stress and reduces nitric oxide bioavailability in the vasculature of rats. **Alcohol [S.I.]**; v.49, p. 47-56. 2015.

GONZALEZ-REYES A, et al. Molecular mechanisms underlying oxytocin-induced cardiomyocyte protection from simulated ischemia-reperfusion. **Mol Cell Endocrinol**, v.412, p.170–81, 2015

GUTKOWSKA J, et al. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94 n.21, p.11704–11709. 1997.

GUTKOWSKA J, et al. Oxytocin is a cardiovascular hormone. **Braz J Med Biol Res**, v. 33 n.6, p.625–633, 2000.

GUTKOWSKA J, JANKOWSKI M. Oxytocin revisited: its role in cardiovascular regulation. **J Neuroendocrinol**. v.24, n.4, p.599–608, 2012

GUTKOWSKA J, et al. Oxytocin decreases diurnal and nocturnal arterial blood pressure in the conscious unrestrained spontaneously hypertensive rat. **Pathophysiology**, v. 23, n. 2, p.111 – 121.

HIDRON A, et al. Cardiac involvement with parasitic infections. **Clin Microbiol Rev**, v.23, n.2, p.324-49, Apr, 2010.

HIGUCHI, M.L.; et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, p.96-107, 2003.

ISERI, S. O. *et al.* Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. **J Surg Res [S.I.]**, v. 126, n. 1, p. 73-81, Jun 1 2005.

JANKOWSKI M, et al. Rat heart: a site of oxytocin production and action. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95 n.24, p.14558–14563, 1998

JANKOWSKI, M. *et al.* Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. **Proc Natl Acad Sci U S A [S.I.]**, v. 97, n. 11, p. 6207-11, May 2000.

JANKOWSKI M, et al. Oxytocin in cardiac ontogeny. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2004; v.101, n.35, p.13074–13079.

JANKOWSKI M, et al. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. **Basic Res Cardiol**, v.105, n.2, p.205–218, 2010

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK, J.C.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.48, p.348-357, 1993.

JOHNSON, C.M.; et al. Unique susceptibility of the fetal thymus to feline immunodeficiency virus infection: an animal model for HIV infection in uterus. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.45, p.273-288, 2001.

KASEMPIMOLPORN, S.; et al. Immunosuppression in rabies virus infection mediated by lymphocyte apoptosis. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.54, p.144-147, 2001.

KIMURA, T. Investigation of the oxytocin receptor at the molecular level. **Adv Exp Med Biol [S.I.]**, v. 395, p. 259-68, 1995.

KLEIN, S.L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunology**, v.26, p.247-264, 2004.

Koberle F. Pathogenesis of Chagas' disease: trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas disease: Ciba Found Symp 20. **Amsterdam Elsevier**, p.137-58, 1974

LEITE DE MORAES, M.C.; et al. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v.77, p.95-99, 1992.

MACHADO FS, et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v.102, n.24, p.3003-8, Dec 12, 2000.

MAUD A; QURESHI A. Parasympathetic nervous system dysfunction and neurological consequences of chagas disease. Mediator or bystander? **J Neuroimaging**, v.20, n.2, p.107-8, Apr, 2010.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v.22, p.477-481, 1997.

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

MARCACCINI, A et al. Pseudorabies virus induces a rapid up-regulation of nitric oxide synthases in the nervous system of swine. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.232-243, 2007.

MARINHO, C.R.; et al. Influence of Acute-Phase Parasite Load on Pathology, Parasitism, and Activation of the Immune System at the Late Chronic Phase of Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v.67, p.308-318, 1999.

MALIK, L.H.; SINGH, G.D.; AMSTERDAM, E.A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease. **Clin Cardiol**, v. 38, p. 565–569, 2015.

MEYMANDI, S, et al. Treatment of Chagas Disease in the United States. **Curr Treat Options Infect Dis.**; v.10, n.3, p.373–388, 2018

MIYAHIRA Y, et al. Critical contribution of CD28–CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from Trypanosoma cruzi infection. **Infect Immun.**; v.71, p.3131-3137, 2003.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.176, p.176: 213-254, 2006.

MOREL CM, LAZDINS J. Chagas disease. **Nat Rev Microbiol**. v.1, n.1, p.14-5, Oct; 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.109-142, 1994.

MONCAYO, A; ORTIZ YANINE M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann Trop Med Parasitol**, v.100, n.8, p.663-77. Dec 2006.

MUKADDAM-DAHER S, YIN YL, ROY J, GUTKOWSKA J, Cardinal R. Negative inotropic and chronotropic effects of oxytocin. **Hypertension**. v.38, n.2, p.292–296, 2001.

MÜLLER, U.; et al. IL-12-independent IFN- γ production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. **Journal of Immunology**, v.167, p.3346-3353, 2001.

MCCONKEY, D.J.; et al. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.269, p.365-370, 1989.

NAVARRO M, et al. Chagas disease in Spain: need for further public health measures. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, n.12, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, J.; et al. Chagas disease is an independent risk factor for stroke: baseline characteristics of a Chagas Disease cohort. **Stroke**. v.36, n.9, p. 2015-7, Sep, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, J. Stroke and brain atrophy in chronic Chagas disease patients: A new theory proposition. **Dement Neuropsychol**. v.3, n.1, p.22-26. Jan-Mar, 2009.

OLIVEIRA-FILHO J, et al. Chagas disease is independently associated with brain atrophy. **J Neurol**. v. 256, n.8, p.1363-5, Aug, 2009.

OLIVEIRA-PELEGRIN GR, et al. Oxytocin affects nitric oxide and cytokine production by sepsis-sensitized macrophages. **NeuroImmunoModulation**; v.20: p.65–71, 2013.

ORTIZ JV, et al. Cardiac Evaluation in the Acute Phase of Chagas' Disease with Post-Treatment Evolution in Patients Attended in the State of Amazonas, Brazil. **Arq Bras Cardiol**. V.112, n.3, p.240-246, Jan 7. **2019**.

OSWALD, I.P.; et al. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a co stimulatory factor for interferon- γ -induced activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.8676-8680, 1992.

PAGANO MA, et al. Cerebral tumor-like American trypanosomiasis in acquired immunodeficiency syndrome. **Ann Neurol**. v.45, n.3, p.403-6, Mar, 1999.

PAIXÃO LC, et al. Chagas disease: independent risk factor for stroke. **Stroke**. v.40 n. 12, p. 3691-4, Dec, **2009**

PÉREZ, A.R.; et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by na immuno-endocrine imbalance. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.21, p.890-900, 2007.

PÉREZ, A.R., et al. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. **J Neuroimmunol**. v.235, n.1-2, p.84-90, Jun, 2011.

Pinazo MJ, et al. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. **PLoS Negl Trop Dis**; v.7, n.1, 2013.

PINTO AYN, et al. Cardiac attacks in patients with acute Chagas' disease in microepidemic familiar episode, in Abaetetuba City, Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34, n.5, p.413-9, 2001

PINTO A.Y., et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil : four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Rev Panam Salud Publica.** v. 25, n. 1, p.77-83, 2009.

PINTO, A.Y., Valente VC, Coura JR, Valente SA, Junqueira AC, Santos LC, et al. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. **PLoS One.** 2013; v. 8, n. 5, 2013.

PITTELLA, J.E. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v.103, n.10, p.973-8. May 19, 2009

PONCE, N.E.; et al. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. **Med. Microbiol. Immunol.** v. 201, p. 145-155, 2012.

PONCE, N.E.; et al. *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas Disease modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells. **Biochim. Biophys. Acta,** v.1832, p. 485-494, 2013.

POZO, D; DELGADO M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather a neuropeptide? **FASEB J.** v.18, p. 1325–1334, 2004.

PY M.O.; Neurologic manifestations of Chagas disease. **Curr Neurol Neurosci Rep.** n.6, p. 536-42, Dec, 2011.

PRADO, J.C.; et al. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Callomys callosus* infected with the “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research,** v.84, p.100-105, 1998.

PRADO, J.C.; et al. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research,** v.85, p.826-29, 1999.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases,** v.1, n. 2, p. 92–100.

PRICE, P.; et al. Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. **Immunology and Cell Biology,** v.71, p.155-165, 1993.

PUNUKOLLU, G., et al. Clinical aspects of the Chagas heart disease. **Int Cardiol.** v. 115, p. 279-83, 2007.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Biological functions of nitric oxide. **Química Nova,** v.22, 1999.

REICHE, E. M. V.; JANKEVICIUS, J. V. Avaliação de métodos alternativos para o diagnóstico laboratorial confirmatório da doença de Chagas. **Rev. Bras. Anal. Clín.,** Brasil, v.29, p. 29-40, 1997.

RIBEIRO, D.A. et al. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected Balb/c mice with *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol.** 2007 Jul; v. 116, n. 3, p. 296-301, Jul, 2007.

RIBEIRO AL, et al. Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. **Int J Cardiol.** 2007 Apr 12; v. 117, n. 1, p. 59-63, Apr 12, 2007.

REED, S.G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In: **Molecular Approaches to Parasitology**. p. 443-445, 1995

RODGERS, J. Trypanosomiasis and the brain. **Parasitology**. v.137, n.14, p.1995-2006, 2010

ROMAY-BARJA M, et al. Chagas screening and treatment among Bolivians living in Madrid, Spain: The need for an official protocol. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, 2019.

ROCHA, M.O., et al. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v.5 n. 4, p. 727-43, Aug, 2007.

ROGGERO, E.; et al. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Endocrinology**, v.190, p.495-503, 2006

ROGGERO, E.; et al. Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.41, p.123-131, 2004.

ROGGERO, E, et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin Exp Immunol.** v.128, n.3, p.421-8, Jun, 2002.

ROSSI M.A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. **Am Heart J**, v. 120, p. 233-6, 1990

SINGEL, K.L.; SEGAL, B.H. NOX2-dependent regulation of inflammation. **Clin Sci (Lond)**. v. 130, n.7, p. 479-90, Apr 1, 2016.

SAEFTEL M, FLEISCHER B, HOERAUF A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.** Apr; v. 69, n.4, p.2252-9, 2001.

SAMUEL, J., M. et al. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. **Am. J. Cardiol.** v.52, p.147-151, 1983.

SANMARCO, M., et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Biochimica e Biophysica**, v. 1863, n.4, p.857-869, April 2017,

SANTELLO, F.H.; et al. Melatonin treatment reduces the severity of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Pineal Research**, v.42, p.359–363, 2007.

SANTOS, C.D.; et al. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. **Acta Tropica**, v.102, p.143-150, 2007.

SANTOS-BUCH, C.A.; ACOSTA, A.M.; TIZARD, I. Pathology of Chagas' disease, Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis. **1985 Boca Raton, FLCRC Press** pg. 145-83, 1985.

SAVINO ,W.; et al. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.18, p.107-124, 2007.

SAVINO W. Endocrine Immunology of Chagas Disease. **Front Horm Res.** v.48, p.160-175. 2017 Feb 28, 2017.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* [S.I.], v. 218, n. 2, p. 121-44, Aug 1 1983.

SHARMAN, A. Vasopressin and its role in critical care. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. v. 8. n. 42008. p. 4.

SILVA, LHP; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folha Clínica Biol São Paulo.** v.20, p.191-201, 1953.

SILVA, J. S. ; et al. 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.* v. 63, n.12, 4862-7, 1995.

Silva, A. C. C., et al. Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains. **Front Pharmacol.** v.2, n.10, p.873, 2019.

SOGAYAR, R.; KIPNIS, T.L.; CURI, P.R. A critical evaluation of the expression of parasitemia in experimental Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p. 395-398, 1993.

STABILE, A.M., et al. Differential role of neurohypophysial hormones in hypotension and nitric oxide production during endotoxaemia. **J.neuroendocrinol**, v.28, n.6, Jun, 2016.

Stabile AM, et al. Central but not systemic inhibition of inducible nitric oxide synthase modulates oxytocin release during endotoxemic shock. **Peptides**, v.31, p. 706–711, 2010.

STAHL, W.; TUREK, G. Chronic murine toxoplasmosis: clinicopathologic characterization of a progressive wasting syndrome. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.82, p.35-48, 1988.

TAN, DX. et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. **J Pineal Res** [S.I.], v.42, n.1, p.28-42, Jan 2007.

TARLETON RL. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Semin Immunopathol.* v.37, p.233-238, 2015.

TARLETON, R.L.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **International Immunology**, v.8, p.13-22, 1996.

TARLETON, R.L. Tumor necrosis factor (cachetin) production during experimental Chagas' disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v.73, p.186-190, 1988.

TARLETON, R.L.; et al. Susceptibility of β 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v.356, p.338-340, 1992.

TAZINAFO, L. F. Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse. 2014. 68f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol.** V. 18, n. 6, 262-5, 2002.

THOMSON, L.; et al. Peroxynitrite affects Ca^{2+} transport in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.98, p.81, 1999.

TORRES-GUTIÉRREZ E, et al. Identification of O-GlcNacylated Proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Front. Endocrinol**, v.10, n.199, 2019.

TRIANCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J Exp Med**, v. 204, p. 239-243, 2007.

TRUYENS, C.; et al. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti- TNF- α , but not by anti-IL-6 or anti-IFN- γ antibodies. **Parasite Immunology**, v.17, p.561-568, 1995.

TRUYENS, C.; et al. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.67, p.5579-5586, 1999.

VAGO, A. R.; et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissue of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v.348, p.891-892, 1996.

VENTURINI G, et al. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 270, n. 2, p. 437-41, 2000, Apr, 13.

VESPA, G. N, et al. 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.** v. 63, n.12, 4862-7, 1995.

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

WANG, S.D.; et al. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. **Journal of Immunology**, v.152, p.5014-5021, 1994.

Wahab F, et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases cerebrospinal fluid nitric oxide levels and increases vasopressin secretion in the late phase of sepsis in rats. **Endocrine**; v. 49, p. 215–221, 2015.

WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet n°. 340. **Wkly Epidemiol Rec.**; v. 85, n. 34, p. 334-36, 2010.

WHO/World Health Organization. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Fact Sheets*. Fact sheets. (2018). Available online at: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed 2018 May, 15).

Wille, E.N. et al. Hunter Interleukin-10 does not contribute to the pathogenesis of a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasit Immunol.** 291-296 v. 23, p. 291-296, 2001.

ZHANG, L; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J Infect Dis.** V. 180, n. 2, p. 480-6, 1999, Aug.

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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Parâmetros neuroimunoendócrinos da doença de Chagas: qual a relação dos hormônios vasopressina e ocitocina e a resposta imune em ratos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*?", registrada sob nº 16.5.249.60.7, sob a responsabilidade de Lucas Favaretto Tazinafo 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).

A proposta foi aprovada na reunião de 30/03/2017 e o relatório final aprovado na reunião de 05/11/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA – FCFRP/USP).

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	04/04/2017 a 02/04/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais aprovados	32
Nº de animais utilizados	32
Peso/Idade	200-250 g/ 7 semanas
Sexo	Ambos
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 06 de novembro de 2019

Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP