UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Grelina: Avaliação da atividade imunomoduladora e cardioprotetora

na fase crônica da Doença de Chagas experimental

Diego Fernando Silva Lessa

Ribeirão Preto 2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Grelina: Avaliação da atividade imunomoduladora e cardioprotetora na fase crônica da Doença de Chagas experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia **Orientado:** Diego Fernando Silva Lessa **Orientadora:** Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

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.

Lessa, Diego Fernando Silva

Grelina: Avaliação da atividade imunomoduladora e cardioprotetora na Doença de Chagas Experimental , 2019. 120p.il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia. Orientadora: Carraro-Abrahão, Ana Amélia.

Doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. Grelina.
4. Imunomodulação 5. Apoptose

Diego Fernando Silva Lessa

Grelina: Avaliação da atividade imunomoduladora e cardioprotetora na fase crônica da Doença de Chagas experimental.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia Orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

Aprovado em:

Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.:		
Instituição:	Assinatura:	

Banca Examinadora

"Conhecer a si mesmo é como flor que desabrocha, é luz que ilumina, é aprimoramento próprio. O amor por si mesmo e para com outro é de essência divina, aquece quem recebe e reconforta quem oferece"

C.E. São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a *Deus*, pelo maravilhoso dom da vida e por permitir que busque a cada dia ser instrumento de sua obra divina.

Aos meus pais **Robson Simões Lessa e Maria Madalena Silva Lessa**, pelo amor incondicional e tudo que fizeram para que este momento fosse possível. Meu amor e gratidão eternos.

Aos meus irmãos *Felipe Augusto Silva Lessa* e *Gabriel Henrique Silva Lessa,* meus melhores amigos, obrigado pelo companheirismo! Amo vocês!

Ao meu avô *Haroldo Lessa (in memoriam)*, pelo exemplo de integridade, amor a família e por ser meu eterno herói.

As minhas avós, Luzia Simões Lessa e Maria Josefa da Silva, por todo amor.

A minha querida orientadora *Ana Amélia Carraro Abrahão*, pela oportunidade ímpar de desenvolver este trabalho, pela confiança em mim depositada, por ser exemplo de professora que ama verdadeiramente a profissão como também de superação pessoal quando a vida lhe pediu tenacidade. Serei a ti sempre grato!

Aos amigos *Mariana Bronzon da Costa* e *Luiz Miguel Pereira* pela inestimável ajuda em todas as etapas deste trabalho, pelo companheirismo, trabalho em equipe e por serem exemplos de pesquisadores. Nunca esquecerei o quanto me ajudaram! Muito obrigado.

Ao amigo *Ferdinando Silva*, parceiro de caminhada e pesquisa, te agradeço por toda ajuda.

As amigas *Cristiane Gonçalez* e *Miriam Toldo*, pelo companheirismo e toda ajuda dada na execução dos experimentos, muito obrigado!

Aos meus professores da graduação, em especial *Marcia Notomi* e *Pierre B. Escodro*, por pelo imenso aprendizado pessoal e profissional que me proporcionaram. Obrigado por continuarem me inspirando.

Aos meus amigos, colegas de clínica, parceiros da amada cardiologia, os agradeço por todo apoio e incentivo dados durante esse período.

Aos queridos professores e funcionários do laboratório de Parasitologia, agradeço por toda ajuda dada de forma direta ou indireta.

Ao **Professor Helio Salgado** da FMRP-USP, departamento de fisiologia, por permitir o uso do equipamento de ecocardiografia, assim como a técnica **Vanessa Nakagi** por todo suporte dado durante os estudos. Aos animais que fizeram parte deste estudo, agradeço-lhes e os homenageio com esse documento.

A Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) juntamente com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo financiamento da pesquisa. Código-2016/18682-3.

A todos que de maneira direta e indireta me ajudaram nesta caminhada, com palavras de incentivo, conselhos e aos seres de luz pelo auxílio espiritual. Os agradeço.

RESUMO

LESSA, D. F. S. Grelina: Avaliação da atividade imunomoduladora e cardioprotetora na Doença de Chagas experimental. 2019. 120 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 2019.

A Doença de Chagas permanece ainda como grave problema de saúde pública, e o (N-benzil-2-nitroimidazol-acetamida), tratamento com 0 benzonidazol única medicação disponível no Brasil para o tratamento tripanocida, têm demonstrado melhores resultados nas fases iniciais do envolvimento cardíaco, não alterando desfecho em pacientes com doença cardíaca bem estabelecida. Dentre os mecanismos mais aceitos para explicar a fisiopatologia da lesão cardíaca, a reação inflamatória desencadeada pela presença do parasita no tecido têm tido maior importância na produção dessas lesões. A Grelina têm demonstrado ação cardioprotetora e anti-inflamatória em diversas condições experimentais, porém até o presente estudo, não foi testada na fase crônica da Doença de Chagas. 36 ratos Wistars foram randomizados em 6 grupos (C: controle, CG: controle tratado com grelina, I: infectado, IG: infectado tratado com grelina, IB: infectado tratado com benzonidazol, IGB: infectado tratado com grelina e benzonidazol) em que o efeito da aplicação da grelina isolada e associada ao benzonidazol foi avaliada no curso de 150 dias de infecção realizada intraperitonealmente com 2 x 10⁵ formas sanguícolas da cepa Y de T. cruzi. Para isso, avaliamos a função cardíaca através da ecocardiografia antes e após o tratamento (120 e 150 dias), biomarcadores de lesão e congestão (Troponina I e T, NT-pro-BNP), histopatologia e PCR cardíacos. Avaliação da apoptose em esplenócitos, dosagem de citocinas pró inflamatórias e moduladoras, análise fenotípica das populações celulares de linfócitos (TCD4+, TCD8+ e NK) foram realizadas para estudo da resposta imune e possível modulação com os tratamentos utilizados. Não foram detectadas alterações morfológicas e funcionais que indicassem lesão cardíaca nos grupos infectados, à despeito da detecção do parasita no tecido cardíaco pelo PCR. Os grupos tratados com grelina demonstraram importante redução da apoptose em esplenócitos, além de redução no percentual de células NK e NKT.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Grelina; Imunomodulação; Apoptose.

ABSTRACT

LESSA, D. F. S.. **Ghrelin: Evaluation of immunomodulatory and cardioprotective activity in experimental Chagas Disease.** 2019. 120 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 2019.

Chagas disease remains a serious public health problem, and treatment with benzonidazole (N-benzyl-2-nitroimidazole-acetamide), the only drug available in Brazil for trypanocidal treatment, has shown better results in the early stages of disease, not altering outcome in patients with well-established heart disease. Among the most accepted mechanisms to explain the pathophysiology of cardiac injury, the inflammatory response triggered by the presence of the parasite in the tissue has been most important factor in the production of these lesions. Ghrelin has been shown cardioprotective and anti-inflammatory action under various experimental conditions, but until the present study, it has not been tested in the chronic phase of Chagas disease. 36 Wistars rats were randomized in 6 groups (C: control, CG: ghrelin-treated control, I: infected, IG: ghrelin-treated infected, IB: benzonidazole-treated infected, IGB: infected ghrelin-treated and benzonidazole) and the ghrelin effects associated or not with benznidazole was evaluated in the course of 150 days of infection, performed intraperitoneally with 2 x 10⁵ blood forms of *T. cruzi* Y strain. For this, we evaluated cardiac function at pre and post-treatment periods by echocardiography (120 and 150 days), injury and congestion biomarkers (Troponin I and T, NT-pro-BNP), cardiac histopathology and PCR. Assays of splenocyte apoptosis, proinflammatory and modulating cytokine profile, phenotypic analysis of lymphocyte cell populations (TCD4⁺, TCD8⁺, and NK) were performed to study the immune response and possible modulation with the treatments used. No morphological and functional alterations were detected in the infected groups, despite the detection of the parasite in cardiac tissue by PCR. The groups treated with ghrelin showed significant reduction of apoptosis in splenocytes, as well as reduction in the percentage of NK and NKT cells.

Key words: Chagas Disease; *Trypanosoma cruzi;* Ghrelin ; Immunomodulation ; Apoptosis.

RESUMEN

LESSA, D. F. S.. Grelina: Evaluación de la actividad inmunomoduladora y cardioprotectora en la enfermedad de Chagas experimental. 2019. 120 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 2019.

La enfermedad de Chagas sigue siendo un grave problema de salud pública y su tratamiento con benzonidazol (N-bencil-2-nitroimidazol-acetamida), el único fármaco disponible en Brasil para el tratamiento tripanocida, ha mostrado mejores resultados en las primeras etapas de compromiso cardiaco no alterando el resultado en pacientes con enfermedad cardíaca totalmente establecida. Entre los mecanismos más aceptados para explicar la fisiopatología de la lesión cardíaca, la reacción inflamatoria desencadenada por la presencia del parásito en el tejido ha sido el mecanismo más importante en la producción de estas lesiones. Se ha demostrado que la Grelina tiene acción cardioprotectora y antiinflamatoria en diversas condiciones experimentales, pero hasta el presente estudio, no se ha evaluado en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Se aleatorizaron 36 ratas Wistars en 6 grupos (C: control, CG: control tratado con grelina, I: infectado, IG: infectado tratado con grelina, IB: infectado tratado con benzonidazol, IGB: infectado tratado con grelina y benzonidazol) donde el efecto de la aplicación de grelina aislada y asociada a benzonidazol se evaluó en el transcurso de 150 días de infección realizada por vía intraperitoneal con 2 x 10⁵ formas sanguíneas de la cepa Y de T. cruzi. Para esto, evaluamos la función cardíaca a través de ecocardiografía previa y posterior al tratamiento (120 y 150 días), biomarcadores de lesión y congestión (Troponina I y T, NT-pro-BNP), histopatología y PCR cardiacos. Evaluación de apoptosis de esplenocitos, dosificación de citocinas proinflamatorias y moduladoras, análisis fenotípica de las poblaciones de células linfocitarias (TCD4 +, TCD8 + y NK) se realizaron para estudiar la respuesta inmune y la posible modulación con los tratamientos utilizados. No se detectaron alteraciones morfológicas y funcionales que indicaran lesión cardíaca en los grupos infectados a pesar de la detección del parásito en el tejido cardíaco por medio de PCR. Los grupos tratados con grelina mostraron una reducción significativa de la apoptosis en los esplenocitos, así como una reducción en el porcentaje de células NK y NKT.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Grelina; Inmunomodulación; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Janela paraesternal direita para obtenção do corte longitudinal 5	
câmaras aquisição do modo M para mensuração das cavidades e espessuras	
parietais em sístole e diástole	24
Figura 2. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras focado em	
ventrículo direito para obtenção do modo M em região de ânulo posterior	
tricúspide e mensuração do TAPSE	24
Figura 3. Janela paraesternal direita,corte em eixo curto ao nível da base	
cardíaca para obtenção dos diâmetros ântero-posteriores de aorta e átrio	
esquerdo	25
Figura 4. Janela paresternal esquerda em corte apical 4 câmaras e fluxo	
transmitral pelo doppler de onda pulsada para medida das ondas E e A	25
Figura 5. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras com	
obtenção do doppler tecidual do anel septal mitral e obtenção das velocidades	
das ondas e' e a'	26
Figura 6. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras com	
obtenção do doppler tecidual do anel lateral mitral e obtenção das velocidades	
das ondas e' L e a' L	26
Figura 7. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras com	
obtenção do doppler tecidual do ânulo tricúspide para medida da velocidade	
sistólica (S'T)	27
Figura 8. Diagrama de fluxo esquemático com os momentos de infecção,	
ecocardiografia, tratamento e eutanásia dos animais	27
Figura 9. Representação do percentual de macrófagos totais obtidos a partir	
do lavado peritoneal de ratos Wistar machos, fase crônica da infecção, nos	
seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina	
(CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com	
benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para	
cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados	
apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não	
compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-	
way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)	45

Figura 10. Representação da expressão do antígeno RT1B+ em macrófagos obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos, fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados apresentados em média e erro padrão da média. p<0,05 (One-way Figura 11. Avaliação das subpopulações de linfócitos CD3+ CD4+ (A) e CD3+ CD8+ (B) no baço de ratos Wistar, na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não Figura 12. Avaliação fenotípica do percentual de linfócitos B (CD45RA+) no baço de ratos Wistar nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 48 Figura 13. Proliferação de esplenócitos, a partir do baço de ratos Wistar nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 50 **Figura 14.** Proliferação de esplenócitos em cultura, a partir do baço de ratos Wistar nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). As células foram marcadas com CFSE, colocadas em meio de cultura durante 4 dias, em contato com ConA e antígenos de T. cruzi. Após a incubação de 4 dias, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD3 (APC) e a proliferação foi avaliada em citômetro de fluxo. Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)....

Figura 16. Marcação de células do baço com Anexina V e lodeto de propídeo nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (PI) para os estágios de apoptose inicial (A), apoptose tardia (B) e células viáveis (C). Grupos que não compartilham a mesma letra ão significantemente diferentes, ANOVA Bonferroni's p<0,05 (One-way е multiple comparison 54 posttests).....

Figura 17. Marcação de células do baço com Anexina V e lodeto de propídeo (incubação da cultura por 24hs) nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com

51

Figura 18. Marcação de células do baço com Anexina V e lodeto de propídeo (incubação da cultura por 24hs, estimuladas com extrato de T. cruzi) nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (PI) para os estágios de apoptose inicial (A), apoptose tardia (B) e células viáveis (C). Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests). Grupos que não compartilham а mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 58

Figura 19. Quantificação da citocina IL-1 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-Figura 20. Quantificação da citocina IL-6 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (Oneway ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 60 Figura 21. Quantificação da citocina IL-10 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0.05 (One-Figura 22. Quantificação da citocina IL-12 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (Oneway ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 62 Figura 23. Quantificação da citocina TNF-α no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-Figura 24. Quantificação da citocina IFN-y no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (Oneway ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 64

viii

Figura 25. Quantificação da citocina TGF-β no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-Figura 26. Quantificação da Troponina I no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 66 Figura 27. Quantificação da Troponina T no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests..... 67 Figura 28. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos. Grupo Controle (C). Hematoxiina-eosina (400X)..... 68 Figura 29. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos. Grupo controle tratado com grelina (CG). Hematoxiina-eosina (400X)..... 69 Figura 30. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de T cruzi. Grupo infectado sem tratamento (I), no 150° dia da infecção. Asecto histológico do coração (A e B). Hematoxilina eosina (400X)..... 70

ix

Figura 31. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de T cruzi e tratados com grelina (IG), no 150° dia da infecção. Aspecto histológico do coração (A e B). Hematoxilina eosina Figura 32. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de T cruzi e tratados com grelina e benzonidazol (IB), no 150° dia da infecção. Aspecto histológico do coração (A e B). Hematoxilina eosina (400X)...... 72 Figura 33. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de T cruzi e tratados com grelina e benzonidazol (IGB), no 150° dia da infecção. Aspecto histológico do coração Figura 34. Detecção de T. cruzi em amostras cardíacas. A sequência S36 foi PCR (5'amplificada por utilizando primers S35 os AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) S36 (5'е GGGTTCGATTGGGGTTGGTG). O DNA foi visualizado sob luz ultra violeta, após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). C = controle não infectado/não tratado; I = infectado; CG = controle tratado com grelina; IG = infectado e tratado com grelina; IB = infectado e tratado com benzonidazol; IGB = infectado e tratado com grelina e benzonidazol. As setas indicam os fragmentos S35/S36 (330 pb) amplificados......74

Х

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos grupos e número de animais utilizados	20
Tabela 2. Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica de	
macrófagos	29
Tabela 3. Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica de	
esplenócitos	31
Tabela 4. Parâmetros ecocardiográficos da análise do modo M e Modo B com	
média e desvio padrão aos 120 dias pós-infecção nos diferentes grupos	
experimentais. Letras diferentes, quando presentes, indicam significância	
estatística entre os grupos. SIVd: Septo interventricular na diástole; SIVs:	
Septo interventricular na sístole; DIVEd: Diâmetro interno do ventrículo	
esquerdo na diástole; DIVEs: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na	
sístole; PLVEd: Parede livre do ventrículo esquerdo na diástole; PLVEs:	
Parede livre do ventrículo esquerdo na sístole; Fej: Fração de ejeção do	
ventrículo esquerdo; FEn: Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo;	
VDF: Volume diastólico final; VDS: Volume sistólico final; AE: Diâmetro	
anteroposterior do átrio esquerdo; AO: Diâmetro anteroposterior da aorta;	
AE/AO: Relação átrio esquerdo/aorta; TAPSE: Excursão sistólica do plano	
anular tricúspide. p<0,05	40
Tabela 5. Parâmetros ecocardiográficos do estudo doppler pulsado e tecidual	
com média e desvio padrão aos 120 dias pós-infecção. Letras diferentes,	
quando presentes, indicam significância estatística entre os grupos. E: Onda	
diastólica de enchimento inicial; A: onda diastólica de enchimento tardio; e':	
onda diastólica inicial do Doppler tecidual no anel septal; a': onda diastólica	
tardia do Doppler tecidual no anel septal; e' L: onda diastólica inicial do Doppler	
tecidual no anel lateral; a' L: onda diastólica tardia do Doppler tecidual no anel	
lateral; E/e': Razão entre as ondas E e e'; S'T: Velocidade da onda sistólica da	
porção lateral do ânulo tricúspide. p<0,05	41
Tabela 6. Parâmetros ecocardiográficos da análise do modo M e Modo B com	
média e desvio padrão aos 150 dias pós-infecção nos diferentes grupos	
experimentais. Letras diferentes, quando presentes, indicam significância	
estatística entre os grupos. SIVd: Septo interventricular na diástole; SIVs:	

xii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A Onda diastólica de enchimento tardio do ventrículo esquerdo
- a' onda diastólica tardia do Doppler tecidual no anel septal
- a' L onda diastólica tardia do Doppler tecidual no anel septal
- **AE** Átrio esquerdo
- AE/AO Relação átrio esquerdo / aorta
- ANOVA Oneway analysis of variance
- AO Aorta
- APC Aloficocianina (Allophycocyanin)
- APCs Células apresentadoras de antígenos
- BSA Albumina sérica bovina (Bovin serum albumin)
- C Controle
- CCC Cardiomiopattia Chagásica Crônica
- CD Designação de grupos (Cluster of differentiation)
- CFSE Carboxifluoresceína succinil éster (Carboxyfluorescein succinimidyl ester)
- CG Animais sem infecção tratados com grelina
- ConA Concanavalina A
- DC Doença de Chagas
- DIVEd Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
- DIVEs Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
- DNA Ácido Desoxirribonucleico
- E Onda diastólica de enchimento inicial do ventrículo esquerdo
- E/A Relação da onda E com a onda A
- E/e' Relação entre a onda E e a onda e'
- e' onda diastólica inicial do Doppler tecidual no anel septal

e' L onda diastólica inicial do Doppler tecidual no anel lateral

EDA em dias alternados

ELISA Enzyme Lynked Immunosorbent Assay

FACS Fluorescence-activated cell sorting

Fej (%) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

FEn(%) Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo

FITC Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)

GH Hormônio de crescimento (Growth hormone)

GHS Secretagogos do Hormônio de Crescimento

GHS-R Receptor Secretagogos do Hormônio de Crescimento

I Controle Infectado

IB Animais infectados tratados com benzonidazol

IFN-γ Interferon Gama

IG Animais Infectados tratados com grelina

IGB Animais infectados tratados com grelina e benzonidazol

IgG Imunoglobulina G

IL Interleucina

IL-10 Interleucina 10

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

iNOS Óxido Nítrico Sintetase Induzida

iTregs Células reguladoras induzidas

LPS Lipopolissacarídeos

mAb anticorpo monoclonal

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

MHz Megahertz

mm milimetro

- mm/s milimetros por segundo
- MTT Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium
- NF- kB Fator nuclear kappa B
- nm nanômetros
- **NK** Células Natural Killer
- NKT Célula natural Killer T
- **NO** Nitric Oxide (Óxido Nítrico)
- NOS Óxido Nítrico Sintetase
- **PBS** Tampão Fosfato Salino (Phosphate-buffered saline)
- PCR Reação em Cadeia da Polimerase
- **PE** Ficoeritrina (*r-phycoerythrin*)
- PECy7 Phycoerythrinconjugated conjugated with cyanine dye 7
- pg/ml picograma por mililitro
- PI lodeto de propídeo
- PLVEd Parede livre do ventriculo esquerdo em diástole
- PLVEs Parede livre do ventrículo esquerdo em sístole
- **RPMI** Meio de Cultura (Roswell Park Memorial Institute)
- S'T Velocidade da onda sistólica da porção lateral do ânulo tricúspide
- SBF Soro Bovino Fetal
- SIVd Septo interventricular em diástole
- SIVs Septo Interventricular em sístole
- TAPSE Excursão sistólica do plano anula tricúspide
- **TGF-β** Fator de Crescimento Transformador- Beta
- Th T Helper
- Th1 T Helper 1

Th2 T Helper 2

TNF-\alpha Fator de Necrose Tumoral Alfa

uL microlitro

- VDF Volume diastólico final do ventrículo esquerdo
- **VSF** Volume sistólico final do ventrículo esquerdo
- WHO World Health Organization

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	х
Lista de Abreviaturas e Siglas	xii
1. INTRODUÇÃO	1

	•
1.1 Doença de Chagas	2
1.2 Cardiomiopatia Chagásica Crônica	5
1.3 Imunologia da Doença de Chagas	8
1.4 Tratamento parasiticida	10
1.5 Grelina	12

2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Gerais	17
2.2 Objetivos Específicos	17

3.2 Infecção	21
3.3 Parasitemia	21
3.4 Tratamento dos Grupos	21
3.5 Dias de experimento e eutanásia	22
3.6 Coleta Sanguínea	22
3.7 Ecocardiografia	23
3.8 Desenho Experimental	27
3.9 Análise fenotípica das células do lavado peritoneal por citometria de	28
fluxo	
3.10 Preparo da suspensão celular do baço e análise fenotípica por citometria	29
de fluxo	

3.11 Obtenção do extrato parasitário da cepa Y de T. cruzi	31
3.12 Análise do padrão de apoptose no baço – Marcação com anexina V	'e 32
iodeto de propídeo	
3.13 Análise de proliferação de esplenócitos por método CFSE	33
3.14 Dosagem das citocinas, troponinas I, T e NT-pro-BNP	34
3.15 Histologia Cardíaca	35
3.16 Detecção de T. cruzi por PCR	35
3.16.1 Extração de DNA de tecido cardíaco	35
3.16.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)	35
3.17 Análise Estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Ecocardiografia	38
4.2 Parasitemia fase crônica	44
4.3 Determinação de macrófagos peritoneais e expressão de RT1B p	or 44
citometria de fluxo	
4.4 Macrófagos RT1B+	46
4.5 Análise das subpopulações de linfócitos CD3+ CD4+ e CD	3+ 47
CD8+	
4.6 Análise do percentual de linfócitos B (CD45RA+)	48
4.7Avaliação da proliferação celular pelo método de CFSE	49
4.8 Análise fenotípica de células NK (CD 161+) e NKT (CD3+ CD161+)	52
4.9 Análise do processo de apoptose e viabilidade celular	53
4.10 Análise do perfil de apoptose e viabilidade celular em cultu	ra 55
(24horas,sem estímulo)	
4.11 Análise do perfil de apoptose e viabilidade celular em cultura (24 hora	is, 57
extrato parasitário	
4.12 Dosagem das Citocinas – IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α , IFN-γ e TG	F- 59
β	
4.12.1 IL-1	59
4.12.2 IL- 6	60
4.12.3 IL-10	61
4.12.4 IL-12	62

4.12.5 TNF-α	63
4.12.6 IFN-γ	64
4.12.7. TGF-β	65
4.13 Dosagens de Troponina I, Troponina T e NT-pro-BNP	66
4.13.1 Troponina I	66
4.13.2 Troponina T	67
4.13.3 NT pro BNP	68
4.14 Histologia Cardíaca	68
4.14.1 Grupo controle sem infecção e sem tratamento (C)	68
4.14.2 Grupo controle tratado com grelina (CG)	69
4.14.3 Grupo infectado sem tratamento (I)	69
4.14.4 Grupo infectado tratado com grelina (IG)	71
4.14.5 Grupo infectado tratado com benzonidazol	72
4.14.6 Grupo infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB)	73
4.15 PCR do coração	74
5. DISCUSSÃO	75
5. CONCLUSÃO	82
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84



INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas (DC)

A DC é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descoberta e descrita por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909), em uma expedição para cidade de Lassance, arraial de Minas Gerais, para investigação de um surto de malária que estava comprometendo os trabalhos no acampamento da Estrada de Ferro Central do Brasil. Ao chegar no local, fora abordado pelo engenheiro responsável que o alertou sobre insetos que viviam em frestas das casas feitas de pau-a-pique, e que durante a noite saíam para picar os trabalhadores, geralmente no rosto, sendo conhecido por este motivo como "barbeiro". Tal evento motivou extensa investigação por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico sanitarista que descreveu de maneira única na ciência o agente etiológico, principal método de transmissão, apresentação clínica e epidemiologia da DC (ANDRADE,2011). À frente das pesquisas de malária, em um primeiro momento Carlos Chagas encontrou no sangue de um sangui um protozoário a que deu no nome de *Trypanosoma minasense* (CHAGAS, 1908).

Após análises em intestinos dos insetos hematófagos naquela região, Chagas encontrou um protozoário cujas características o fizeram pensar estar diante de um estágio evolutivo do próprio *T. minasense,* recém descrito, ou de um novo parasita de vertebrados e do homem. Sem recursos para prosseguir o estudo de modo mais detalhado em seu laboratório num vagão de um trem, Chagas enviou barbeiros para o seu supervisor Oswaldo Cruz, no Instituto Manguinhos no Rio De Janeiro (BENCHIMOL & SILVA, 2008). Carlos Chagas dedicou estudos sistemáticos acerca do protozoário em questão, pois desconfiava que poderia ser um parasita humano. Em abril de 1909, o médico então encontra a presença de *T. cruzi* em uma criança de 2 anos, com febre, chamada Berenice (CHAGAS 1909,c).

Quanto à sua origem, a Doença de Chagas estava confinada a animais silvestres e tratava-se de uma enzootia em que espécies como marsupiais, quirópteros, roedores, e primatas dentre outros abrigavam o parasita. Além disso, os triatomíneos silvestres transmitiam o parasita neste meio, mantendo o ciclo (COURA, 2002).

O protozoário causador da doença pertence ao Filo Sarcomastigophora Ordem Kinetoplastida, gênero Trypanosoma. Devido ao fato deste parasita possuir cinetoplasto volumoso e modo específico de multiplicação, pesquisadores o consideraram pertencente ao subgênero Schizotrypanum (CHAGAS 1909, NEVES *et al.*, 2017)

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* do tipo heteroxênico, em que o parasita passa obrigatoriamente por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado, e outra fase multiplicativa extracelular no hospedeiro invertebrado, insetos hemípteros, hematófagos, dos gêneros Panstrongylus, Rhodnius e Triatoma pertencentes à família Triatomidae (COURA, 2002; JUNQUEIRA *et al.*, 2010; AZAMBUJA & GARCIA, 2017).

No Cone Sul, houve uma campanha maciça para eliminação do *Triatoma infestans*, principal vetor do *T. cruzi* no Brasil. Levando-se em consideração que outras espécies de triatomíneos silvestres podem transmitir o parasita, é fundamental a manutenção da vigilância epidemiológica constante (CEBALLOS *et al.*, 2006)

Após mais de um século de sua descoberta, a DC continua figurando como relevante problema de saúde pública nos países da América Latina sendo a terceira doença parasitária mais prevalente, depois da malária e esquistossomose (LEE,

2013). Estimam-se que aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, com a ocorrência de 36.800 novos casos ao ano, estando a maior parte desta população situada em países latinos americanos. Nestes países, a doença de Chagas mata mais que qualquer outra doença parasitária. Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde, são 14.000 mortes/ ano. O Primeiro Relatório da Organização Mundial de Saúde sobre Doenças Tropicais Negligenciadas, estimou 752 mil dias de trabalho perdidos ao ano devido às mortes causadas pela doença na América Latina. O gasto estimado é de 1,2 bilhão de dólares em produtividade perdida (WHO, 2016).

Apesar de sua maior prevalência nesses países, a imigração legal e ilegal de indivíduos infectados provenientes de regiões endêmicas para outros países que até então não tinham registros da doença, foi determinante para que aproximadamente 300.000 pessoas infectadas estejam vivendo nos Estados Unidos de acordo com último estudo epidemiológico publicado (BERN, 2009). Outros países como: Canadá, Espanha, França, Suiça, Itália, Japão, países emergentes da Ásia e Austrália passassem a documentar casos, levando a globalização da doença (SCHMUNIS, 2007).

De acordo com sua evolução a DC pode ser classificada em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda pode ocorrer em decorrência da infecção primária ou por reativação em indivíduos cronicamente infectados. Após a infecção primária, a fase aguda cursa com duração entre 6-8 semanas e seu quadro clínico se assemelha a outras miocardites, com manifestações sistêmicas de febre, taquicardia não compensatória, esplenomegalia e edema (ANDRADE, 2011). Quando a porta de entrada for a conjuntiva ocular, o hospedeiro pode apresentar edema palpebral unilateral associado a aumento de volume do linfonodo satélite pré-auricular, sinal semiológico conhecido como Sinal de Romaña. Esse edema inflamatório aparece em 10 a 20% dos casos agudos da doença de Chagas, como um sinal característico da doença e foi descrito em 1935 por Cecilio Romaña,

A fase crônica pode ser assintomática (ou indeterminada) e sintomática. A fase indeterminada por durar de 10 a 30 anos, sendo que dessa população, cerca de 30 a 40% poderão desenvolver sintomatologia grave associada ao sistema cardiovascular e insuficiência cardíaca congestiva levando-os a morte e/ou desenvolvimento de desordens gastrointestinais, tais como, megacólon e megaesôfago (BONNEY, 2014).

Assim, quatro situações clínicas distintas podem ocorrer: a forma indeterminada, forma cardíaca, forma digestiva e a forma mista, com acometimento cardíaco e digestivo no mesmo hospedeiro.

1.2. Cardiomiopatia Chagásica Crônica

A forma cardíaca, denominada cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), pode afetar cerca de 20-30% dos indivíduos infectados, sendo essencialmente uma miocardiopatia dilatada, em que a inflamação crônica mediada pelo parasita, usualmente de baixa intensidade, mas incessante, provoca destruição tissular progressiva e fibrose extensa do miocárdio. Esta forma subdivide-se em: forma cardíaca sem disfunção ventricular e forma cardíaca com disfunção ventricular, destacando-se nessa classificação o principal marcador prognóstico, a disfunção ventricular.

Pacientes com a forma cardíaca da doença necessitam de acompanhamento cardiológico periódico, assim como realização de exames complementares como

eletrocardiografia, ecocardiografia, radiografias torácicas, dosagem de biomarcadores de lesão cardiomiocitária (Troponinas I e T) e de congestão (NT-pro-BNP), para estabelecer o diagnóstico, prognóstico e melhor estratégia terapêutica para as alterações cardiocirculatórias encontradas (ANDRADE et al., 2011; BASQUIERA et al., 2003; RAHMAN & BROADLEY, 2014).

Em uma coorte composta por pacientes com fenótipo de cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva, a identificação do agente etiológico (*T. cruzi*) conferiu pior prognóstico de maneira independente aos dados clínicos e ecocardiográficos, demonstrando que pacientes com cardiomiopatia chagásica, quando comparados a pacientes com cardiomiopatia dilatada primária, apresentavam pior evolução apenas pelo componente infeccioso/inflamatório da doença (NUNES et al., 2010).

Uma série de mecanismos foram postuladas para explicar a deterioração miocárdica e por consequência a alteração da função cardíaca na CCC como disautonomia cardíaca. Estudos necroscópicos e funcionais demonstraram intensa despopulação neuronal das fibras do sistema nervoso parassimpático cardíaco, privando esses pacientes de resposta inibitória vagal, ajustes cronotrópicos rápidos em situações adaptativas normais, como alterações posturais e atividade física, mediadas pelo sistema parassimpático (KOBERLE, 1968; MARIN-NETO, 2007). Embora essas alterações morfofuncionais sejam detectadas no sistema autonômico cardíaco, sua ocorrência e intensidade são variáveis, e não se correlacionam de maneira estrita com o grau de disfunção ventricular, não podendo assim, a conhecida "teoria neurogênica", explicar de forma convincente a destruição miocárdica na CCC (ANDRADE, 2011).

Distúrbios na microcirculação cardíaca podem estar presentes, associados a modificações do tônus e reatividade vasculares, disfunção endotelial e alterações na atividade plaquetária, levando a formação de microtrombos e complicações de ordem isquêmica, tendo como principal causa o dano inflamatório diretamente relacionado ao parasita, porém o distúrbio perfusional resultante amplifica a resposta inflamatória (ANDRADE, 1994). Tais alterações podem estar relacionadas a formação de aneurismas ventriculares, sendo mais conhecido como aneurisma apical, ou de ponta, do ventrículo esquerdo, situação potencialmente trombogênica e de alto risco para acidente vascular encefálico (HIGUSHI, 2003). Assim como a "teoria neurogênica", os distúrbios da microcirculação, mesmo que existentes, não ocorrem de maneira independente na CCC, embora contribuam para exacerbar a resposta inflamatória adversa.

Dentre os mecanismos mais aceitos para explicar a fisiopatogenia da CCC, a resposta imunológica e inflamação dependentes da presença parasitária no miocárdio representam os principais pilares da etiologia da doença. Após longa fase assintomática (indeterminada), caracterizada pelo equilíbrio dos mecanismos imunológicos modulados para uma resposta protetora (anti-inflamatória), há, por motivos ainda não elucidados, perda desse status imunológico "quiescente" para uma condição de resposta inflamatória intensa, necrose e fibrose teciduais progressivas. É importante ressaltar, que características inerentes ao hospedeiro e sua competência imunológica, como carga parasitária, cepa do parasita e tempo de infecção podem diferenciar os indivíduos que evoluem a dano tecidual importante daqueles que mantém-se com a infecção e dano tecidual controlado (TALVANI, 2006; ANDRADE, 2011).

Estudos histológicos revelaram ausência ou paucidade parasitária em corações com extenso dano tecidual (ANDRADE & ANDRADE, 1955), porém ensaios mais elaborados detectaram, com maior sensibilidade, a presença de reação antígeno-anticorpo através de imuno-histoquímica, e DNA do parasita por PCR (JONES et al., 1993). Tendo em vista intensa inflamação encontrada em corações chagásicos associada a pequena carga parasitária tecidual, cristaliza-se o conceito de que este tipo de cardiomiopatia seja essencialmente um processo inflamatório-infeccioso, sendo necessário avaliar em possíveis estratégias terapêuticas se o tratamento tripanocida aliado ao controle da resposta imunológica adversa podem modificar a história natural a doença.

1.3. Imunologia da Doença de Chagas

O sistema imunológico tem por função fisiológica primordial a defesa contra substâncias e microrganismos infecciosos. Os diversos mecanismos imunológicos que combatem as infecções e protegem o organismo de moléculas estranhas podem ocasionar lesão tecidual em algum momento. A defesa contra microrganismos acontece em duas vias distintas, em reações ocasionadas pela imunidade natural ou adquirida. Os mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares presentes no sistema imune funcionam em homeostase e estão programados para proteção contra agentes externos e patógenos (BURNET, 1971 ; ABBAS, 2008).

A imunidade que reage contra patógenos é constituída, essencialmente, por barreiras físicas e químicas, células do sistema monofagocitário, células NK, frações do sistema complemento, mediadores de inflamação e citocinas. Essa é a primeira linda de defesa contra infecções (SILVERSTEIN, 2001; JANEWAY et al., 2001). Por outro lado, a imunidade adquirida ou adaptativa é gerada ao longo da vida mediante à exposição a agentes infecciosos. Esse sistema é estimulado por meio da exposição ao microrganismo infeccioso, que, uma vez reconhecido, gera uma memória imunológica. Tal memória protege o organismo de futuras infecções por um mesmo antígeno. Os principais componentes da resposta imunológica adquirida são os linfócitos B, T e seus produtos (ALBERTS, 2002; ABBAS, 2008).

Na infecção por *T. cruzi*, o parasita infecta as células nucleadas do hospedeiro por meio de um arsenal de proteínas. As principais são as polimórficas de superfície (glicosilfosfatidilinositol - GPIs), trans-sialidases, mucinas, dentre outras, essenciais para formação do vacúolo parasitóforo (DE PABLOS & OSUNA, 2012; BARTHOLOMEU *et al.*, 2014).

T. cruzi invade preferencialmente os macrófagos e após vários ciclos de duplicação, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos que infectam as células vizinhas (ANDRADE *et al.*, 2014). A resposta imunológica inata durante a fase aguda é mediada principalmente por linfócitos NK produtores de INFγ para ativação dos macrófagos e consequente produção de óxido nítrico para a lise parasitária (FILTJENS *et al.*, 2016; DA COSTA, 2017).

Uma vez que as formas tripomastigotas atingem a corrente sanguínea, o parasita utiliza suas proteínas de superfície como calreticulina e GP160 para controlar a contornar a lise e a opsonização mediadas pelo sistema complemento (NORRIS et al., 1994; FERREIRA *et al.*, 2004).

Estudos em camundongos monstraram, por sua vez, que a infecção chagásica crônica é caracterizada pela expansão clonal de células T CD8 enquanto a infecção no homem induz a uma redução na capacidade da resposta imune contra antígenos de *T.cruzi*. Embora existam respostas imunes robustas em roedores e
humanos, a infecção crônica não pode ser eliminada pelo sistema imunológico. Na infecção crônica, o número de parasitas é reduzido, porém linfócitos TCD8 destroem as células que contém amastigotas, o que caracteriza a atividade citolítica dessas células associadas às lesões teciduais a longo prazo (DOS REIS, 2011; TARLETON, 2015).

1.4. Tratamento parasiticida

Estima-se que mais de 7,19 bilhões de dólares/ano são gastos no mundo no tratamento de pacientes com CCC, em razão da elevada taxa de complicações clínicas da cardiomiopatia, que implicam em altos custos hospitalares e de monitoração nessa população (LEE, 2013). As terapias vigentes destinadas ao parasita apresentam-se pouco eficazes em pacientes cronicamente infectados, na contramão dos altos índices de cura reportados na fase aguda da infecção (BERN, 2015).

Atualmente o benzonidazol e o nifurtimox são as únicas drogas disponíveis para o tratamento da DC, sendo apenas o benzonidazol disponível no Brasil.

O benzonidazol possui atividade anti-*T. cruzi*, tendo como mecanismo de ação a inibição direta da síntese de DNA do parasita, atuando principalmente nas formas extracelulares, ou seja, a tripomastigota (MAYA *et al.*, 2007). Esse medicamento é indicado especialmente em casos agudos em que a infecção tenha ocorrido por transmissão natural, transfusão sanguínea ou acidental e doença imunossupressora (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). É consenso que todos os pacientes que manifestem a forma aguda da doença, seja por primoinfecção ou reagudização da infecção crônica, devam receber tratamento parasiticida, exceto gestantes, pelo conhecido potencial teratogênico da droga (ANDRADE *et al.*, 2011).

A terapia com benzonidazol pode apresentar complicações relacionadas a sua tolerância em uma parcela de pacientes que apresentam efeitos colaterais como: dermatite alérgica (29-50%); parestesia (0-30%), neuropatia periférica (0-30%), anorexia e perda de peso (5-40%), náusea e vômitos (0-5%), leucopenia e trombocitopenia (<1%) levando a interrupção precoce do tratamento em 7 a 20% dos casos onde a droga é utilizada (BERN, 2015).

Em estudo prospectivo, multicêntrico (5 países da América Latina), randomizado, placebo controlado, duplo-cego, chamado BENEFIT, avaliou-se em uma população de 2854 pacientes com CCC, se a terapia com o benzonidazol modificaria o tempo até os seguintes desfechos primários: morte, reanimação por parada cardiorrespiratória, colocação de marcapasso ou cardiodesfibrilador implantável, taquicardia ventricular sustentada, novo episódio de insuficiência cardíaca aguda, acidente vascular encefálico e tromboembolismo sistêmico/pulmonar. Não houve diferença com significância estatística entre os pacientes do grupo benzonidazol e placebo em relação ao tempo até o desfecho primário estabelecido. O estudo concluiu que apesar da terapia com benzonidazol reduzir a detecção parasitária pelo método molecular utilizado (PCR), não houve redução na deterioração clínica nos 5 anos de segmento analisados, indicando que em pacientes com CCC, o tratamento tripanocida, de forma isolada, não modificou o curso natural e complicações da doença (MORILLO *et al.*, 2015).

À despeito dos sólidos resultados e metodologia empregada no estudo BENEFIT, os resultados expressaram o comportamento da doença de em diferentes países, com cepas diferentes de *T. cruzi,* logo podendo conferir heterogeneidade geográfica sobre a resposta terapêutica. Analisando de forma isolada os resultados deste estudo no Brasil, foi visto forte tendência em redução do desfecho primário (baseado em morbidade e mortalidade), e na análise post-hoc, houve menor taxa de hospitalizações em pacientes tratados com benzonidazol (RASSI et al., 2017).

Em recente coorte com 1813 pacientes acompanhados por um período de 2 anos, composta por dois grupos, um tratado com benzonidazol e outro não tratado, foi demonstrado significativa redução de morte por doença cardíaca e dos marcadores de agravamento da doença de base (alterações eletrocardiográficas, elevação do NTpro-BNP e positividade no PCR) nos pacientes que receberam o benzonidazol. Vale ressaltar que, ao contrário do estudo BENEFIT, a terapia foi iniciada de maneira mais precoce em relação aos critérios de: média de idade dos indivíduos e critérios de gravidade clínica. Tais resultados ajudam a elucidar o atual panorama de incerteza sobre os benefícios da terapia com benzonidazol na fase crônica, especialmente nas fases mais precoces da doença (CARDOSO et al., 2018).

1.5. Grelina

A grelina é um peptídeo constituído de 28 aminoácidos o qual foi isolado do estômago de ratos e humanos sendo identificado no ano de 1999 por um grupo de cientistas japoneses (KOJIMA *et al.*, 1999). É produzida em maior quantidade na camada submucosa do estômago, nas células oxínticas endócrinas (X/A) situadas em adjacência aos capilares e sem contato com o lúmen estomacal (KORBONITS *et al.*, 2004). Em adição, pequenas quantidades de grelina também são produzidas em outros órgãos, tais como: coração, pulmão, rins, pâncreas, placenta, tecido linfático,

tireóide, glândula pituitária, hipotálamo, alguns tecidos neoplásicos e linhagens de células cancerígenas (ZHANG *et al.*, 2010).

Atua como um ligante endógeno para o receptor secretagogo do hormônio de crescimento (GHS-R) (CAO *et al.*, 2013). O GHS-R é um receptor acoplado a uma proteína-G que se liga à grelina para estimular a liberação do hormônio do crescimento (GH). No sistema cardiovascular, existem dois subtipos de GHS-R expressos, o GHS-R tipo 1a e GHS-R tipo 1, no entanto a forma funcional é representada pelo GHS-R tipo 1a, sendo encontrada em outros órgãos como: sistema linfoide, pâncreas, trato reprodutivo e sistema nervoso central (SMITH *et al.*, 2001; GRANATA *et al.*, 2011). O miocárdio constitui uma importante fonte de grelina (IGLESIAS *et al.*, 2004), e a expressão de GHS-R1a em cardiomiócitos sugere a existência de mecanismo autócrino/parácrino da grelina no coração (BEIRAS-FERNANDEZ *et al.*, 2010).

Uma série de estudos vêm demonstrando a atividade cardioprotetora da grelina. Os efeitos positivos associados a grelina são: redução da pressão arterial (diminuição de pós-carga); efeito inotrópico positivo; proteção endotelial; aumento do metabolismo energético do miocárdio; regulação de aterosclerose; prevenção de lesões por isquemia/reperfusão e melhora no prognóstico de infarto do miocárdio (CHANG *et al.*, 2004; NAGAYA *et al.*, 2001; LEDDEROSE, 2011). Também é relatada redução da inflamação cardíaca e endotelial através das respectivas inibições da produção de citocinas pró-inflamatórias, da ligação de células mononucleares e inibição da ativação do fator-kappa B nuclear (NF-kB) em células endoteliais; supressão dos níveis de TNF-α e IL-6 miocárdicas (CAO *et al.*, 2013).

ZHANG *et al.* (2009) demonstraram o efeito da grelina na inibição do estresse do retículo endoplasmático (ERS) em corações de ratos com isquemia cardíaca induzida. Foi demonstrado nesse estudo que ratos com lesão cardíaca isquêmica, tratados com grelina, apresentaram melhora do quadro através da redução do ERS e caspase-12, conferindo atividade antiapoptótica, sugerindo a capacidade dos cardiomiócitos de sobreviverem a forte estresse.

CAO *et al.* (2013) investigaram os efeitos da grelina na resposta inflamatória e na injúria cardíaca induzida por CPB (cardiopulmoray bypass). Estes pesquisadores encontraram evidências de que a grelina inibia a resposta inflamatória local e sistêmica nestes animais. O estudo mostrou que os níveis séricos e miocárdicos das citocinas IL-6 e TNF-α encontravam-se elevados nos animais com injúria miocárdica, e o tratamento com grelina diminuiu significantemente os níveis destas citocinas pro-inflamatórias.

SHATI & DALLAK (2019) demonstraram importante atividade antiapoptótica da grelina por meio da redução da ativação extrínseca via Fas/FasL na lesão cardíaca, em ratos, induzida por doxorrubicina, agente quimioterápico amplamente utilizado em protocolos para o câncer de mama, com elevados índices de cardiotoxicidade.

No tocante a sua atividade anti-inflamatória, desde sua descoberta, uma série de estudos utilizando a grelina em situações experimentais pro-inflamatórias como: sepse por punção cecal, injeção intraperitoneal, intratraqueal e endovenosa de LPS; nefrectomia; ligadura de colédoco, isquemia miocárdica, entre outros, demonstraram que a administração exógena da grelina reduziu a quantificação de citocinas pró-inflamatórias. Destacam-se, nesses estudos, dentre os principais mecanismos anti-inflamatórios atribuídos a grelina, a inibição do fator NFkB e ativação do sistema nervoso parassimpático (LI *et al.*, 2004; GONZALEZ-REY *et al.*, 2006; DEBOER *et al.*, 2008; CHORNY *et al.*, 2008; ISERI *et al.*, 2008).

Tendo em vista a atividade cardioprotetora e anti-inflamatória extensamente comprovadas da grelina, ausência de estudos na fase crônica da doença de Chagas

e crescente demanda por novas terapias que visem não apenas o controle parasitário, mas também supressão da resposta imune adversa e dano tecidual irreversível, o propósito deste trabalho foi avaliar se a aplicação exógena de grelina, isolada e associada com o benzonidazol, modifica a resposta imune, perfil apoptótico e função cardíaca na fase crônica da doença de Chagas experimental.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar o efeito da administração exógena da grelina sobre a função cardíaca e resposta imunológica na fase crônica da Doença de Chagas em ratos Wistar infectados pela cepa Y de *T. cruzi.*

2.2. Objetivos específicos

•Avaliar se a grelina reduz a quantificação do parasitismo sanguíneo e tecidual, assim como estudar as possíveis lesões histológicas causadas pelo parasita.

 Avaliar se a grelina apresenta efeitos antiapoptóticos em esplenócitos por ensaio de Anexina V e lodeto de Propídeo.

• Interrogar os efeitos da grelina sobre os valores citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TGF- β , TNF- α e IFN- γ .

- Avaliação fenotípica das populações celulares (CD3⁺, TCD4⁺, TCD8⁺, células NK) por citometria de fluxo.
- Descrever os efeitos do tratamento com grelina e/ou benzonidazol sobre as variáveis função cardíaca por meio do estudo ecocardiográfico e quantificação dos biomarcadores sanguíneos de lesão e congestão (Troponina I, T e NT-pro- BNP).

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1 Animais

Trinta e seis (36) ratos machos adultos de linhagem Wistar, com peso entre 90-100 gramas, foram utilizados neste estudo. Os animais são provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto.

Durante este estudo, os animais foram devidamente ambientados no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências de Ribeirão Preto (FCFRP–USP), abrigados em caixas plásticas, sendo respeitado o limite de 2 animais por caixa, à temperatura de 23 \pm 2°C, com ciclo claro escuro 12/12 horas.

Todos os animais receberam ração específica para roedores e água *ad libitum*. As caixas e as maravalhas foram higienizadas a cada 3 dias, evitando assim, o acúmulo de amônia, conforme preconizado pelos padrões de experimentação animal e normas adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Protocolo experimental: 14.1.712.53.7.

Grupos	Som	Tratados	Tratados com	Tratados com
Grupos	Jem	Tratados		
(ratos Wistar)	tratamento	com Grelina	Benzonidazol	Grelina e
				Benzonidazol
Controle (C)	n=6	-	-	_
Controle Grelina (CG)	-	n=6	_	_
Infectado (I)	n=6	-	-	-
Infectado Tratado Grelina (IG)	_	n=6	_	_
Infectado Tratado Benzonidazol (IB):	-	-	n=6	-
Infectado Tratado Grelina Benzonidazol (IGB):	_	-	-	n=6

 Tabela 1: Descrição dos grupos e número de animais utilizados

Grupos Controles:

Controle (C): Animais sem infecção e sem tratamento (n=6)

Controle Tratado (CG): Animais sem infecção tratados com grelina (n=6)

Grupos Infectados pela cepa Y de T. cruzi:

Infectado (I): Animais infectados sem tratamento (n=6)

Infectado Tratado (IG): Animais infectados tratados com grelina (n=6)

Infectado Tratado Benzonidazol (IB): Animais infectados tratados com benzonidazol

(n=6)

Infectado Tratado Grelina e Benzonidazol (IGB): Animais infectados tratados com grelina e benzonidazol (n=6)

3.2 Infecção

Os animais foram infectados intraperitonealmente (i.p) com 100.000 formas tripomastigotas sanguicolas de Y de *T. cruzi*. Essa cepa foi isolada por SILVA & NUSSENZWIG (1953) por meio do xenodiagnóstico em paciente na fase aguda da doença. A cepa Y é altamente virulenta e possui pico parasitêmico entre o 7°e 14° dia após o inóculo (DA COSTA et al., 2018). Além disso, essa cepa tem morfologia delgada e está associada à alta mortalidade e lesões tissulares graves.

A cepa Y é mantida no laboratório em camundongos Swiss não isogênicos e os repiques com o sangue infectado são realizados semanalmente.

3.3 Parasitemia

A parasitemia foi realizada no 8° dia após a infecção (pico de parasitêmico) e 14° dia para a confirmação da infecção, pelo método de Brener (BRENER, 1962)..

A análise parasitêmica também foi realizada nos 120º e 150º dias após a infecção. Todos os animais apresentaram ausência das formas tripomastigotas sanguícolas, o que determina que os animais avaliados se encontravam fase crônica da infecção chagásica experimental.

3.4 Tratamento dos grupos

Os animais foram tratados a partir do 120°após infecção. A grelina (R&D Systems, TOCRIS, USA) foi diluída em solução salina estéril, administrada via subcutânea na dose de 100µg/Kg/ EDA (SOEKI et al., 2013), durante 30 dias.

O Benzonidazol (LAFEPE, Brasil), foi administrado via oral (gavage), na dose de 100mg/kg/dia (DINIZ et al., 2013), por 3 semanas.

3.5 Dias de experimento e eutanásia

Para avaliar a função cardíaca e resposta ao tratamento com grelina, a ecocardiografia foi realizada em dois momentos distintos: 120 dias p.i. (pós-infecção), antes de iniciar o tratamento, e 150 dias p.i., ao final do tratamento (Figura 1).

Os animais foram eutanasiados ao 150° da infecção por decaptação e anestesia prévia com isoflurano a 5% via inalatória, conforme as diretrizes adotadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Protocolo experimental: 14.1.712.53.7.

3.6 Coleta sanguínea

Para a contagem dos parasitas sanguíneos realizou-se a venopunção (veia dorsal da cauda), com auxílio de um cateter (angiocath 24g – BD – Nova Jersey – USA) e colhidos 5µL de sangue. Essa alíquota foi transferida para uma lâmina de microscopia, coberta com lamínula 22x22 mm. O número de parasitas é determinado pelo número total de campos lidos na lamínula, no aumento de 400 vezes e dividido por 50. (BRENER, 1962).

3.7 Ecocardiografia

Para realização do exame, os animais foram anestesiados com quetamina (40mg/kg) e xilazina (5mg/kg) por via intramuscular, tiveram a região precordial tricotomizada, e posteriormente foram submetidos ao estudo ecocardiográfico realizado com o equipamento Vevo 2100 (VisualSonics®, Toronto, Canadá) acoplado a transdutor linear multifrequencial (13,5-15MHz) sendo todos os estudos realizados por um único observador sem conhecimento do grupo a cada animal pertencia. As Imagens foram obtidas em janelas paraesternais esquerda e direita para obtenção de cortes em eixo curto e longo. O modo M foi utilizado para medir espessuras parietais, diâmetros sistólico e diastólico e calcular a fração de ejeção (FEj) e de encurtamento (FEn) do ventrículo esquerdo pela fórmula de Teichholz como também para obtenção da excursão sistólica do plano anular tricúspide, o TAPSE (Figuras 2 e 3). Para avaliar o diâmetro anteroposterior de átrio esquerdo e aorta, foi utilizado o modo B em corte de eixo curto ao nível da base cardíaca (Figura 4). O Doppler de onda pulsada foi utilizado para análise do fluxo transmitral e mensuração da onda E, velocidade diastólica de enchimento inicial, e a onda A velocidade diastólica de enchimento tardio (Figura 5). O Doppler tissular (Figuras 6, 7 e 8) foi empregado na obtenção das velocidades de relaxamento iniciais e tardias da parede septal (e' e a') e parietal (e'L e a' L.) como também na avaliação da velocidade sistólica do ventrículo direito da porção lateral do ânulo tricúspide (S'T). Todos os parâmetros foram obtidos de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e Sociedade Europeia de Imagem Cardiovascular (LANG et al., 2015).

Figura 1. Janela paraesternal direita para obtenção do corte longitudinal 5 câmaras aquisição do modo M para mensuração das cavidades e espessuras parietais em sístole e diástole.



Figura 2. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras focado em ventrículo direito para obtenção do modo M em região de ânulo posterior tricúspide e mensuração do TAPSE.





Figura 3. Janela paraesternal direita,corte em eixo curto ao nível da base cardíaca para obtenção dos diâmetros ântero-posteriores de aorta e átrio esquerdo.

Figura 4. Janela paresternal esquerda em corte apical 4 câmaras e fluxo transmitral pelo doppler de onda pulsada para medida das ondas E e A.





Figura 5. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras com obtenção do doppler tecidual do anel septal mitral e obtenção das velocidades das ondas e' e a'.

Figura 6. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras com obtenção do doppler tecidual do anel lateral mitral e obtenção das velocidades das ondas e' L e a' L.



Figura 7. Janela paraesternal esquerda em corte apical 4 câmaras com obtenção do doppler tecidual do ânulo tricúspide para medida da velocidade sistólica (S'T).



3.8 Desenho Experimental

Figura 8. Diagrama de fluxo esquemático com os momentos de infecção, ecocardiografia, tratamento e eutanásia dos animais.



3.9 Análise fenotípica das células do lavado peritoneal por citometria de fluxo

Para a análise fenotípica das células do lavado peritoneal (macrófagos), alíquotas de 120µL (2x10⁶células/poço) foram distribuídas em tubos para citometria (Corning). À essa suspensão celular, foram adicionados 150µL de paraformaldeído 3,72% v/v por 10 minutos em gelo. Em seguida, as amostras foram lavadas com 500µL de tampão fosfato-salino gelado (PBS) (1x), centrifugadas a 3600 rpm por 4 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado.

Em seguida, foram adicionados 50µL de *Fcblock* (CD32 1:100), diluído em tampão *Cell Staining Buffer* (BD Biosciences Pharmingen) e as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Ao término da incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado, sendo submetidas à centrifugação de 3600 rpm por 4 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Após a centrifugação, *pellet* foi ressuspenso e incubados com anticorpos monoclonais anti - Macrophage e anti - RT1B (BD Bioscience Pharmigen) (Tabela 2) por 30 minutos a 4°C, ao abrigo da luz.

Todos os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences Pharmingen, e utilizados na diluição 1:100µL. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado e submetidas à centrifugação de 3600 rpm por 4 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Ao término, foi adicionado ao *pellet* 150µL de *Cell Staining Buffer* (BD Bioscience Pharmigen). A leitura das amostras foi realizadas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACS-canto e analisadas em software DIVA-BD (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

Anticorpo	Clone	Concentração
Anti - rat Macrophage subset-PE	HIS36	0,2mg/mL
Anti-rat RT1B – PerCP	OX-6	0,2mg/mL

Tabela 2. Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica de macrófagos:

3.10 Preparo da suspensão celular do baço e análise fenotípica por citometria de fluxo

Em condições assépticas, o baço de cada animal foi removido cirurgicamente e transportado para uma placa de Petri pequena, contendo 5mL de RPMI-1640 incompleto. Posteriormente, este baço foi cuidadosamente macerado com auxílio de êmbolos estéreis peneiras cell strainer (BD) estéreis. A suspensão de células esplênicas foi transferida para tubos cônicos (Falcon) e submetida à centrifugação de 1800 rpm durante 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado. Em seguida, foi adicionado 2mL de tampão hemolítico ACK (NH4CL 0,15M, KHCO3 1mM, Na2EDTA 0,1mM) durante 2 minutos, à temperatura ambiente. Após centrifugação a 1800 rpm por 10 minutos, as células foram ressuspensas em 10mL de RPMI-1640 incompleto. Esta suspensão de células permaneceu em repouso por 10 minutos a 4°C para sedimentação de fragmentos tissulares (matriz), que posteriormente foram removidos. Em seguida, após homogeneização cuidadosa dos tubos, acrescentou-se 5µL desta suspensão celular em 495µL de solução de Azul de Trypan (0.4%) para a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer. Depois disto, as concentrações foram acertadas para 2x10⁷ células/mL; 2x10⁶ por tubo em meio RPMI-1640 incompleto, para cada animal.

A análise fenotípica das subpopulações de linfócitos foi realizada por citometria de fluxo, com a marcação por anticorpos monoclonais dirigidas contra antígenos de superfície das células de interesse neste estudo. Alíquotas de 100µL da suspensão de células esplênicas (2x10⁶celulas) foram distribuídas em tubos de citometria, e fixados com 150µL de paraformaldeído 3,72% por 10 minutos em banho de gelo. Após lavagem com PBS (1x) gelado e centrifugação de 3600 rpm por 4 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 50µL de *Fcblock* diluído em tampão *Cell Staining Buffer.* Essas amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Ao fim da incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado, sendo submetidas à centrifugação de 3600 rpm por 4 minutos en os potrenadante descartado.

O *pellet* foi ressuspenso e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C (ao abrigo da luz) com anticorpos monoclonais para as seguintes subpopulações de linfócitos: anti-CD3-APC, anti-CD4-PECy-7, anti-CD8-PercP, anti-CD45RA-PE, anti-CD161-FITC.

Neste experimento, todos os anticorpos foram obtidos da BD Biosciences Pharmingen, e utilizados na diluição 1:100µL (Tabela 3). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado e submetidas à centrifugação de 3600 rpm por 4 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, *pellet* foi resuspenso em 150µL de de *Cell Staining Buffer* (BD). A análise foi realizada em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACS-canto com software DIVA (BD).

Anticorpo	Clone	Concentração
Anti-rat CD3 – APC	1F4	0,2mg/mL
Anti-rat CD4 – PECy-7	OX-35	0,2mg/mL
Anti-rat CD8 – PercP	OX-8	0,2mg/mL
Anti-rat CD45RA – PE	OX-33	0,2mg/mL
Anti-rat CD161a – FITC	10/78	0,5mg/mL

Tabela 3. Anticorpos monoclonais utilizados na análise fenotípica de esplenócitos:

3.11 Obtenção do extrato parasitário da cepa Y de T. cruzi

As formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas a partir de culturas de células LLCMK2. As células LLCMK2 foram infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* e mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma- Aldrich – Ltda) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco) por cinco dias em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C, obtendo-se uma cultura uniforme e confluente.

Após este período, as formas tripomastigotas foram submetidas à centrifugação por 1000 rpm durante 10 min a 4°C, para precipitação dos debris. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado por 5000 rpm por 10 min a 4°C, para a precipitação dos parasitas. Este sedimento resultante foi lavado cinco vezes em PBS gelado (pH - 7.2) a 3000 rpm por 5 minutos. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os parasitas ressuspensos em 1,5mL de PBS gelado, sendo então, realizado três a cinco de sonicação (20KHz, 30 watts), sendo 30 segundos por ciclo, para lise parasitária e obtenção do extrato. O sobrenadante resultante foi filtrado (membrama 0,45µm) e transferido para eppendorfs estéreis, e congelados à -80°C (BRAZÃO *et al.*, 2015).

O antígeno específico de *T. cruzi* obtido foi usado nos ensaios *in vitro* de proliferação celular de esplenócitos (CFSE) e apoptose. A concentração do extrato parasitário utilizada nos ensaios foi de 300µg/mL (proteínas solúveis quantificadas por método de Bradford).

3.12 Análise do padrão de apoptose no baço – Marcação com anexina-V e iodeto de propídeo

Para a análise do processo de apoptose, a suspensão de células esplênicas (100µL), acertadas para 2x10⁶ células/tubo, com meio RPMI-1640 incompleto, foi distribuída em tubos de citometria. Estas células foram centrifugadas a 3600 rpm por 4 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se às suspensões celulares, 100µL da solução tampão de ligação de anexina-V (*Annexin Binding Buffer* – BD Biosciences Pharmingen) diluído 1:10 em água purificada e 1µL de anexina-V FITC (isotiocianato de fluoresceína). As células foram incubadas por 15 minutos (ao abrigo da luz) à temperatura ambiente. No momento da leitura em citômetro de fluxo, foi adicionado 1µL de iodeto de propídeo (PI).

Adicionalmente, foi realizada a análise de apoptose de esplenócitos em cultura celular (*in vitro*). Para esta análise, as células (2x10⁶ células/poço) foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas em estufa de atmosfera úmida a 5% CO₂ por um período de 24 horas. As amostras também foram distribuídas e incubadas com antígeno específico de *T. cruzi* (300µg/mL). Após o período de incubação, as células foram transferidas para tubos de citometria e lavadas duas vezes (volume de 200µL) em tampão *Annexin Bindding Buffer* (BD) e centrifugadas a 3600rpm por 4 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet foi* ressuspenso com tampão

de ligação *Annexin Bindding Buffer* diluído e anexina-V (FITC), em diluição 1:100. Prosseguiu-se a incubação de 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente (BRAZÃO *et al.*, 2015). No momento da leitura, foi adicionado PI em diluição 1:100 e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan com software DIVA (BD).

3.13 Análise da proliferação de esplenócitos por método de CFSE

Para realização do ensaio de esplenócitos, estas células foram ajustadas, na concentração de 2x10⁶células/mL, sendo em seguida ressuspensas em PBS (1x) préaquecido (37°C) e incubados com 1,1µL de CFSE (do inglês, *"carboxyfluorescein succinimidyl" ester* – BD Biosciences Pharmingen) (5µM), durante 10 minutos ao abrigo da luz a 37°C. Os tubos contendo as suspensões celulares foram agitados gentilmente de forma periódica a cada 2 minutos para assegurar uma marcação homogênea. Em seguida, a marcação foi bloqueada pela adição de meio RPMI-1640 (gelado) contendo 5% de SBF. Em seguida, os tubos foram agitados gentilmente e deixados à temperatura ambiente por 1 minuto. Após o tempo, estes foram submetidos à centrifugação de 8000 rpm por 1 minuto a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em meio RPMI-1640.

Alíquotas desta suspensão (100µL) foram distribuídas em tubos de citometria para leitura basal, em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan (BD), e em placas de 96 poços com fundo redondo (incubadas ao abrigo da luz) em estufa de atmosfera úmida (5% de CO₂), durante 4 dias a 37°C. Ambos, na presença de antígenos específicos de *T. cruzi* (300µg/mL) e Concanavalina A (ConA – 2,5µg/mL) (SIGMA, USA). Após o término da incubação, as células foram aspiradas da placa e distribuídas

em tubos de citometria, sendo que, cada poço da placa, foi lavado três vezes com 100µL de PBS (1x). Em seguida, adicionou-se 100µL de *Fcblock* diluído em tampão de *Cell Staining Buffer*, com posterior incubação por 20 minutos a 4°C, ao abrigo da luz.

Após o término desta incubação, as células em suspensão foram lavadas com PBS (1x) gelado, sendo submetidas à centrifugação de 3600 rpm por 4 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD₃ APC (aloficocianina), diluídos em tampão *Cell Staining Buffer* (diluição 1:100µL), com posterior incubação por 30 minutos, a 4°C, ao abrigo da luz (LYONS & PARISH, 1994; WANG *et al.*, 2007).

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS (1x) gelado e submetidas à centrifugação de 3600 rpm por 4 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao *pellet* 150µL de paraformaldeído 1%, diluído em PBS (1x) gelado. A análise foi realizada em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan com software DIVA (BD).

3.14 Ensaios imunológicos – Dosagens de Citocinas, Troponinas I, T e NT-pro-BNP

Dosagens de TGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, Troponinas I e T e NT-pro-BNP foram mensuradas nas amostras de soro dos animais com Kits de ELISA (R&D Systems, INC, USA; Biolegend Inc.San Diego, CA). Os testes foram realizados em duplicata de acordo com as instruções do fabricante de cada Kit utilizado. As leituras foram feitas em leitor de ELISA (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA).

3.15 Histologia cardíaca

O coração foi extraído cirurgicamente e lavado em solução salina 0,9% estéril, com posterior fixação em solução de ALFAC (mistura de álcool etílico, formol e ácido acético) por 24 horas. Após este período, o ALFAC foi retirado e substituído por álcool etílico 80%, até a inclusão do órgão em parafina. Foram confeccionados cortes histológicos de 6µM de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE). O parasitismo foi determinado através da análise quantitativa do número de ninhos de amastigotas observados em todo corte histológico do coração (400x).

3.16 Detecção de T. cruzi por PCR

3.16.1 Extração de DNA de tecido cardíaco

O DNA genômico do tecido cardíaco de todos os grupos foi então extraído com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega - USA), conforme manual. Porções (10 – 15 mg) de uma região semelhante do coração (região média da parede ventricular) foram utilizadas. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro e normalizado para 50 ng/μl.

3.16.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

O DNA de *T. cruzi* foi detectado por PCR, utilizando os primers S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'-GGGTTCGATTGGGGGTTGGTG) que amplificam uma região de 330 pb (STURM, 1989). A PCR foi realizada com o uso do kit GoTaq® Green Master Mix (Promega). Cada amostra foi composta de 25 μ M GoTaq® Green Master Mix (20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0,2 mM de dNTP mix; 1,5 mM de MgCl₂, Taq polimerase), 20 pmol de cada primer, 100 ng de DNA e água DNAse free num volume total de 50 μ l. O DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE e visualizado sob luz UV com brometo de etídio (0,5 μ g/ml).

3.17 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente pelo programa computacional GraphPad Prism[®] versão 5.0 (Graph Pad Software, USA).

A comparação entre os grupos experimentais foi realizada através da análise de variância, One Way ANOVA seguido do post-test de Bonferroni.

A análise estatística da parasitemia sanguínea e do parasitismo cardíaco dos animais dos grupos infectados (I e IG) foi realizada utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Considerou-se estatisticamente significante p<0,05.

Resultados

4 – RESULTADOS

4.1 Ecocardiografia

Os estudos ecocardiográficos foram realizados em todos os animais (6 animais por grupo, totalizando 36 animais) nos dois tempos determinados (120 e 150 dias), não havendo, por limitações técnicas do exame, exclusão de qualquer animal desta avaliação. As variáveis ecocardiográficas obtidas aos 120 e 150 dias estão apresentadas nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

A análise da função sistólica do ventrículo esquerdo através da fração de ejeção (FEj) e encurtamento (FEn) não demonstrou diferença com significância estatística entre os diferentes grupos experimentais no período pré-tratamento (120 dias) e ao final da terapia (150dias). As dimensões internas do ventrículo esquerdo em sístole e diástole e seus volumes (DIVEd, DIVEs, VDF e VSF), espessuras parietais em sístole e diástole (SIVd, SIVs, PLVEd e PLVEs), diâmetros anteroposteriores de aorta e átrio esquerdo e sua razão normalizada (AE/AO) não apresentaram diferença com significância estatística

Na avaliação da função sistólica do ventrículo direito, avaliada através das variáveis de excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE) e velocidade anular tricúspide (S'T), não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais no período pré-terapia (120 dias) e após terapia (150 dias).

A avaliação da função diastólica foi obtida em 100% dos animais, não havendo fusão das ondas diastólicas (E e A) em nenhum animal, o que impossibilitaria a avaliação individual destes dois componentes. As ondas E e A do fluxo transmitral não apresentaram diferença com significância estatística entre os grupos nos dois períodos estudados. A média da relação E/A foi maior que 1 e menor que 2 em todos os grupos estudados, sem variação significativa na velocidade da onda E, indicando preservação da função diastólica em todos os grupos estudados. O estudo de doppler tecidual dos anéis septal e lateral da valva mitral demonstrou redução significativamente estatística na velocidade da onda e' L no grupo infectado (I) quando comparado ao grupo controle tratado com grelina (CG) no período pós-tratamento (150dias). No entanto não foi encontrada diferença estatisticamente significante da velocidade da onda e' L do grupo I comparado aos grupos infectados tratados com grelina e benzonidazol isolados e em associação (IG, IB, IGB). As demais variáveis derivadas do doppler tecidual não apresentaram significância estatística entre os grupos nos tempos estudados.

Tabela 4. Parâmetros ecocardiográficos da análise do modo M e Modo B com média e desvio padrão aos 120 dias pós-infecção nos diferentes grupos experimentais. Letras diferentes, quando presentes, indicam significância estatística entre os grupos. SIVd: Septo interventricular na diástole; SIVs: Septo interventricular na sístole; DIVEd: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole; DIVEs: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole; PLVEd: Parede livre do ventrículo esquerdo na diástole; PLVEd: Parede livre do ventrículo esquerdo na diástole; VDF: Volume diastole; SIVS: Volume sistólico final; VDS: Volume sistólico final; AE: Diâmetro anteroposterior do átrio esquerdo; AO: Diâmetro anteroposterior da aorta; AE/AO: Relação átrio esquerdo/aorta; TAPSE: Excursão sistólica do plano anular tricúspide. p<0,05.

Parâmetro	С	CG	I	IGB	IB	IG	р
SIVd (mm)	1,946±0,163	2,102±0,158 b	2,383±0,201 a	2,023±0,213	1,915±0,235 b	1,956±0,272 b	0,0082
SIVs (mm)	2,724±0,281	2,907±0,172	3,105±0,294	2,851±0,413	2,749±0,364	2,810±0,430	0,4272
DIVEd (mm)	8,597±0,387	8,548±0,798	8,112±1,032	8,674±0,506	8,609±0,849	9,038±0,668	0,468
DIVEs (mm)	5,517±0,524	5,212±0,694	5,041±0,869	5,391±0,693	5,303±0,683	5,707±0,851	0,709
PLVEd (mm)	2,248±0,153	2,287±0,356	2,362±0,346	2,166±0,373	2,177±0,271	2,303±0,355	0,888
PLVEs (mm)	3,083±0,432	3,343±0,050	3,524±0,196	3,073±0,410	3,431±0,366	3,278±0,3585	0,161
Fej (%)	63,08±6,45	67,42±4,59	66,22±4,94	65,49±7,16	66,39±5,82	63,90±10,45	0,911
FEn(%)	35,81±4,67	39,16±3,52	38,04±3,94	37,94±5,65	38,36±4,75	36,87±7,88	0,933
VDF (uL)	405,3±40,68	403,9±82,78	361,7±104,1	414,0±52,54	409,9±87,97	454,5±72,33	0,508
VSF (uL)	148,2±36,11	132,8±41,47	124,8±50,52	143,5±41,60	138,2±40,15	164,6±54,54	0,735
AE (mm)	6,866±0,343	6,423±0,143	7,193±0,639	6,510±0,728	5,989±0,716	6,984±1,094	0,071
AO (mm)	4,817±0,213	4,794±0,195	5,188±0,698	4,674±0,118	4,746±0,467	4,910±0,388	0,379
AE/AO	1,422±0,066	1,336±0,078	1,428±0,146	1,388±0,136	1,260±0,128	1,415±0,168	0,226
TAPSE (mm)	3,234±0,349	3,301±0,695	3,363±0,481	3,113±0,538	3,763±0,430	3,247±0,381	0,291

Tabela 5. Parâmetros ecocardiográficos do estudo doppler pulsado e tecidual com média e desvio padrão aos 120 dias pós-infecção. Letras diferentes, quando presentes, indicam significância estatística entre os grupos. E: Onda diastólica de enchimento inicial; A: onda diastólica de enchimento tardio; e': onda diastólica inicial do Doppler tecidual no anel septal; a': onda diastólica tardia do Doppler tecidual no anel septal; e' L: onda diastólica inicial do Doppler tecidual no anel lateral; a' L: onda diastólica tardia do Doppler tecidual no anel lateral; E/e': Razão entre as ondas E e e'; S'T: Velocidade da onda sistólica da porção lateral do ânulo tricúspide. p<0,05.

Parâmetro	С	CG	I	IGB	IB	IG	р
							•
E (mm/s)	753,5±116,8	778,1±56,8	725,2±93,8	741,3±37,6	808,3±131,0	835,0±166,1	0,523
A (mm/s)	466,6±31,3	509,8±66,7	487,6±67,6	453,4±67,6	499,0±77,3	515,4±49,7	0,513
E/A	1,598±0,307	1,472±0,264	1,507±0,296	1,660±0,246	1,620±0,159	1,622±0,316	0,834
e' (mm/s)	36,97±4,78	35,33±4,48	34,36±3,61	32,00±5,66	35,35±6,19	36,60±6,54	0,668
a' (mm/s)	29,40±9,71	27,04±2,27	24,69±3,30	25,59±4,55	28,73±5,52	31,09±7,89	0,465
e' L (mm/s)	40,26±12,45	35,28±6,53	38,20±13,06	33,65±1,58	41,51±3,19	37,85±4,90	0,585
a' L (mm/s)	32,75±9,71	37,93±2,31	31,28±10,3	28,11±3,62	31,28±6,37	33,70±10,96	0,496
E/e'	20,60±4,13	21,30±2,21	20,74±3,57	23,22±3,72	23,51±4,43	23,17±4,70	0,644
S'T (mm/s)	87,43±15,26	77,51±20,05	82,49±11,27	81,87±14,25	83,93±13,82	89,69±20,15	0,849

Tabela 6. Parâmetros ecocardiográficos da análise do modo M e Modo B com média e desvio padrão aos 150 dias pós-infecção nos diferentes grupos experimentais. Letras diferentes, quando presentes, indicam significância estatística entre os grupos. SIVd: Septo interventricular na diástole; SIVs: Septo interventricular na sístole; DIVEd: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole; DIVEs: Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole; PLVEd: Parede livre do ventrículo esquerdo na diástole; PLVEs: Parede livre do ventrículo esquerdo na sístole; Fej: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; FEn: Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; VDF: Volume diastólico final; VSF: Volume sistólico final; AE: Diâmetro anteroposterior do átrio esquerdo; AO: Diâmetro anteroposterior da aorta; AE/AO: Relação átrio esquerdo/aorta; TAPSE: Excursão sistólica do plano anular tricúspide. p<0,05.

Parâmetro	С	CG	I	IGB	IB	IG	Р
SIVd (mm)	2,039± ,2084	2,049±0,097	2,330±0,062	2,247±0,282	2,028±0,217	2,130±0,232	0,056
SIVs (mm)	2,957±0,289	2,994±0,284	3,073±0,157	2,946±0,259	2,893±0,297	2,958±0,307	0,918
DIVEd (mm)	8,593±0,741	8,294±0,857	8,073±1,340	8,037±0,533	8,300±0,720	8,447±0,545	0,871
DIVEs (mm)	5,359±0,811	5,060±0,790	5,226±0,581	5,152±0,539	5,215±0,711	4,955±0,382	0,928
PLVEd (mm)	2,274±0,263	2,193±0,165	2,575±0,403	2,265±0,189	2,252±0,143	2,313±0,320	0,246
PLVEs (mm)	3,021±0,576	3,272±0,141	3,460±0,222	3,235±0,378	3,015±0,194	3,474±0,332	0,120
Fej (%)	65,53±7,07	67,55±5,24	61,47±7,27	64,84±3,91	65,22±5,36	69,85±5,23	0,257
FEn(%)	37,73±5,49	39,19±4,08	34,49±5,56	36,89±2,88	37,34±4,23	41,20±4,47	0,234
VDF (uL)	407,2±77,45	377,6±86,45	362,0±116,9	349,8±51,33	377,0±71,23	390,7±56,01	0,871
VSF (uL)	142,4±50,64	125,0±43,15	133,0±31,53	124,0±29,16	106,9±50,83	116,6±20,77	0,742
AE (mm)	6,651±0,781	6,835±0,401	7,463±0,633	6,941±0,915	7,173±0,477	7,315±0,403	0,305
AO (mm)	5,056±0,340	5,107±0,162	5,306±0,468	5,122±0,164	4,993±0,304	5,149±0,497	0,777
AE/AO	1,312±0,126	1,334±0,066	1,407±0,079	1,353±0,192	1,438±0,158	1,452±0,135	0,445
TAPSE (mm)	3,290±0,062	3,341±0,347	3,271±0,197	3,555±0,291	3,480±0,288	3,674±0,564	0,281

Tabela 7. Parâmetros ecocardiográficos do estudo doppler pulsado e tecidual com média e desvio padrão aos 120 dias pós-infecção. Letras diferentes, quando presentes, indicam significância estatística entre os grupos. E: Onda diastólica de enchimento inicial; A: onda diastólica de enchimento tardio; e': onda diastólica inicial do Doppler tecidual no anel septal; a': onda diastólica tardia do Doppler tecidual no anel septal; e' L: onda diastólica inicial do Doppler tecidual no anel lateral; a' L: onda diastólica tardia do Doppler tecidual no anel septal; e' S'T: Velocidade da onda sistólica da porção lateral do ânulo tricúspide. p<0,05.

Parâmetro	С	CG	I	IGB	IB	IG	Р
E (mm/s)	807,4±130,3	843,4±74,25	683,4±77,75	794,2±139,7	763,9±107,0	732,4±95,52	0,197
A (mm/s)	478,9±92,78	579,6±33,15	479,9±35,53	474,5±107,4	453,4±121,1	465,9±43,72	0,176
E/A	1,690±0,144	1,446±0,203	1,418±0,128	1,740±0,494	1,766±0,82	1,507±0,227	0,566
e' (mm/s)	34,28±3,92	32,85±3,48	27,92±3,56	34,47±8,52	30,15±3,59	30,58±5,34	0,251
a' (mm/s)	34,25±15,05	27,53±5,55	26,36±4,96	31,38±8,759	28,15±4,611	27,78±6,381	0,629
e' L (mm/s)	38,31±2,93	39,88±5,1 a	28,34±3,17 b	36,00±2,92	38,97±7,79	36,92±9,50	0,030
a' L (mm/s)	35,33±8,48	29,65±7,7	24,82±5,73	29,68±5,03	33,62±4,96	35,68±8,07	0,084
E/e'	23,59±4,62	25,83±2,91	24,60±2,18	21,18±3,86	25,51±3,5	25,31±6,81	0,474
S'T (mm/s)	70,61±6,55	77,21±7,26	95,45±8,3	84,49±9,04	73,56±4,37	90,90±7,16	0,647

4.2 Parasitemia na fase crônica

A parasitemia foi avaliada 120º e 150º dias da infecção. Todos os animais apresentaram ausência de tripomastigotas no sangue, indicando que todos estavam na fase crônica da infecção.

4.3 Determinação de macrófagos peritoneais e expressão de RT1B por citometria de fluxo

Na fase crônica da infecção, o grupo infectado sem tratamento (I) apresentou redução estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle (C). O tratamento dos animais infectados com grelina produziu um aumento no percentual de macrófagos em relação ao grupo infectado sem tratamento, no entanto não foi estatisticamente significante (Figura 9).

Figura 9. Representação do percentual de macrófagos totais obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos, fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).


4.4 Macrófagos RT1B⁺

Em relação à expressão de RT1B em macrófagos, a comparação entre os grupos mostrou que o tratamento com grelina e/ou benzonidazol não alterou a expressão desta molécula em macrófagos nos grupos estudados (Figura 10).

Figura 10. Representação da expressão do antígeno RT1B⁺ em macrófagos obtidos a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar machos, fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados apresentados em média e erro padrão da média. p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.5 Análise das subpopulações de linfócitos CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD8⁺

O tratamento dos animais infectados com grelina (IG) ou benzonidazol (IB) isoladamente não alterou as populações de linfócitos TCD4+ e TCD8+. No entanto, o tratamento dos ratos infectados com a associação de grelina e benzonidazol (IGB) aumentou o percentual dessas células quando comparado ao grupo infectado sem tratamento (IG). (Figura 11).

Figura 11. Avaliação das subpopulações de linfócitos CD3⁺ CD4⁺ (A) e CD3⁺ CD8⁺ (B) no baço de ratos Wistar, na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes.



4.6 Análise do percentual de linfócitos B (CD45RA⁺)

A comparação entre os grupos estudados mostrou que o tratamento com grelina e/ou benzonidazol não alterou o percentual de linfócitos B (CD45RA⁺) na fase crônica da infecção. (Figura 12).

Figura 12. Avaliação fenotípica do percentual de linfócitos B (CD45RA⁺) no baço de ratos Wistar, na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais em cada dia de experimento n=6; resultados apresentados em média e erro padrão da média. Os grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.7 Avaliação da proliferação celular pelo método de CFSE

O perfil de proliferação celular de células do baço foi analisado com células marcadas com CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*). Essa molécula fluorescente se liga a proteínas do citoplasma e é distribuída a células filhas. Nossos resultados mostram que na fase crônica da infecção a proliferação celular basal (Figura 13) não apresenta diferenças estatisticamente significantes nos diferentes grupos estudados.

A análise de proliferação celular em cultura (4 dias), nos poços sem estímulo (meio RPMI), apresentou uma redução estatisticamente significante entre o grupo controle tratado com grelina (CG) quando comparado ao grupo controle sem tratamento (C). Nesta mesma análise, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados (Fig. 14 A).

Para os poços estimulados com Concanavalina-A, observamos um aumento significante da população de esplenócitos para o grupo controle tratado com grelina (CG) quando comparado ao grupo controle sem tratamento (C). O mesmo acontece para o grupo infectado tratado com grelina e/ou benzonidazol (IG, IB, IGB) quando comparado ao grupo infectado (I) (Fig. 14 B).

A avaliação da proliferação celular de 4 dias, em poços estimulados com extrato parasitário, mostrou aumento estatisticamente significante entre os grupos infectados tratados com grelina (IG), benzonidazol (IB) ou associação das substâncias (IGB) quando comparados ao grupo infectado sem tratamento (I) (Fig. 14 C).

(GB

CFSE – Basal

Figura 13. Proliferação de esplenócitos, a partir do baço de ratos Wistar (fase crônica da infecção), nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).





CFSE em cultura – 72 horas

Figura 14. Proliferação de esplenócitos em cultura, a partir do baço de ratos Wistar (fase crônica da infecção), nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). As células foram marcadas com CFSE, colocadas em meio de cultura durante 4 dias, em contato com ConA e antígenos de *T. cruzi.* Após a incubação de 4 dias, as células foram marcadas com anticorpo anti-CD3 (APC) e a proliferação foi avaliada em citômetro de fluxo. Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).







4.8 Análise fenotípica de células NK (CD 161+) e NKT (CD3+ CD161+)

A percentagem de células NK foi reduzida no grupo infectado tratado com grelina (IG) e infectado tratado com ambos os fármacos (IGB), quando comparados ao grupo infectado (I) (Fig. 15 A). Não foram observadas alterações estatísticas significantes nas células NKT para grupos IG, IB e IGB em comparação com o grupo infectado (I) (Fig. 15 B).

Figura 15. Porcentagem de células NK (A) e NKT (B) na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média.Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.9 Análise do processo de apoptose e viabilidade celular

Os gráficos abaixo mostram a análise do processo de apoptose celular na infecção chagásica experimental crônica. Os grupos IG, IB e IGB apresentaram significativa redução da porcentagem de células no estágio inicial e tardio de apoptose quando comparados ao grupo infectado não tratado, sendo essa redução estatisticamente significante (Figuras 16A e 16B).

Por outro lado, observa-se um aumento na porcentagem de células viáveis para os grupos IG, IB e IGB quando comparados ao grupo infectado sem tratamento (I), sendo a diferença estatisticamente significante (Figura 16C). **Figura 16**. Marcação de células do baço com Anexina V e lodeto de propídeo nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (PI) para os estágios de apoptose inicial (A), apoptose tardia (B) e células viáveis (C). Grupos que não compartilham a mesma letra ão significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).





(C)



4.10 Análise do perfil de apoptose e viabilidade celular em cultura (24 horas, sem estímulo)

Os gráficos abaixo mostram a análise do processo de apoptose em cultura de 24 horas, sem estímulo parasitário. Os grupos IG, IB e IGB apresentaram uma redução estatisticamente significante nos estágios inicial e tardio de apoptose, quando comparados ao grupo infectado sem tratamento (Fig. 17A e 17B).

Houve um aumento estatisticamente significante no percentual de células viáveis nos grupos IG, IB e IGB quando comparados ao grupo I (Figura 17C).

Figura 17. Marcação de células do baço com Anexina V e lodeto de propídeo (incubação da cultura por 24hs) nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (PI) para os estágios de apoptose inicial (A), apoptose tardia (B) e células viáveis (C). Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).









4.11 Análise do perfil de apoptose e viabilidade celular em cultura (24 horas, extrato parasitário)

Os gráficos abaixo mostram a análise do processo de apoptose em cultura de 24 horas, com estímulo de extrato de *T. cruzi*. Os grupos IG e IBG apresentaram uma redução estatisticamente significante nos estágios inicial e tardio de apoptose, quando comparados ao grupo infectado sem tratamento (I) (Fig. 18A e 18B). Observou-se um aumento significante de células viáveis no grupo IGB quando comparado ao I (Fig. 18C).

Figura 18. Marcação de células do baço com Anexina V e lodeto de propídeo (incubação da cultura por 24hs, estimuladas com extrato de *T. cruzi*) nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo (PI) para os estágios de apoptose inicial (A), apoptose tardia (B) e células viáveis (C). Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).





4.12 Dosagens das Citocinas - IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TGF- β , TNF- α e IFN- γ

4.12.1 IL-1

A Figura 19 mostra a dosagem de IL-1 nos diferentes grupos experimentais.

Os resultados estão apresentados em densidade óptica (leitura em 450nm).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no perfil desta

citocina.

Figura 19. Quantificação da citocina IL-1 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da médiaGrupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.12.2 IL-6

A Figura 20 mostra o perfil de IL-6 nos diferentes grupos experimentais.Os resultados estão representados em densidade óptica (leitura 450nm).Não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados para esta citocina.

Figura 20. Quantificação da citocina IL-6 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.12.3 IL-10

O gráfico abaixo (Fig 21) mostra o perfil de IL-10 no soro de ratos Wistar nos diferentes grupos experimentais.Os dados estão representados em densidade óptica (leitura 450nm). O grupo infectado e tratado com grelina apresentou um discreto aumento de IL-10, porém não significativo.

Figura 21. Quantificação da citocina IL-10 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina e benzonidazol (IG). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).

(1000 - 10

IL-10

4.12.4 IL-12

A Figura 22 mostra as concentrações de IL-12 (pg/mL) nos diferentes grupos experimentais.Observa-se um aumento estatisticamente significante desta citocina no grupo infectado tratado com grelina (IG) quando comparado aos grupos infectado sem tratamento (I) e infectado tratado com benzonidazol (IB).

Figura 22. Quantificação da citocina IL-12 no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).





4.12.5 TNF-α

A Figura 23 mostra a quantificação da citocina TNF-α nos diferentes grupos

experimentais.Não houve diferenças estatisticamente significantes nestas análises.

Figura 23. Quantificação da citocina TNF-α no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média.Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.12.6 IFN-γ

A Figura 24 representa a dosagem de IFN-α (pg/mL) no soro de ratos Wistar nos diferentes grupos experimentais estudados.Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Figura 24. Quantificação da citocina IFN-γ no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.12.7 TGF-β

O gráfico abaixo mostra as concentrações de TGF-β no soro de ratos Wistar nos diferentes grupos experimentais. O tratamento com os fármacos não alterou o perfil desta citocina nos diferentes grupos estudados (Figura 25).

Figura 25. Quantificação da citocina TGF-β no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina e benzonidazol (IG). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média.Grupos que não compartilham a mesma letra são significantemente diferentes, p<0,05 (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.13 Dosagens de Troponina I, Troponina T e NT-pro-BNP

4.13.1 Troponina I

A Figura 26 mostra a quantificação de Troponina I no soro dos animais na fase crônica da doença de Chagas experimental crônica. Não houve alteração estatisticamente significantes entre os grupos analisados.

Figura 26. Quantificação da Troponina I no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.13.2 Troponina T

O gráfico abaixo mostra a dosagem de Troponina T no soro dos animais nos diferentes grupos experimentais. Os dados estão apresentados em densidade óptica (leitura 450nm). Não houve alterações estatisticamente significantes nestas análises

(Fig. 27).

Figura 27. Quantificação da Troponina T no soro dos animais na fase crônica da infecção, nos seguintes grupos experimentais: controle (C), controle tratado com grelina (CG), infectado (I), infectado tratado com grelina (IG), infectado tratado com benzonidazol (IB) e infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB). Para cada grupo de animais n=6; os resultados estão apresentados em média e erro padrão da média. (One-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests).



4.13.3 NT-pro-BNP

A dosagem desse peptídeo mostrou resultados inferiores ao limite de detecção do KIT de ELISA, indicando valores reduzidos no soro dos animais controles e infectados.

4.14 Histologia Cardíaca

4.14.1 Grupo controle sem infecção e sem tratamento (C)

O aspecto histológico do coração dos animais controles (sem infecção e sem

tratamento) está apresentado na Figura 20.

Figura 28. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos. Grupo Controle (C). Hematoxiina-eosina (400X).



4.14.2 Grupo controle tratado com grelina (CG)

O aspecto histológico do coração dos animais controles tratados com grelina (CG) mostrou-se semelhante ao grupo controle sem tratamento (C) (Figura 29). O tratamento dos animais sem infecção tratados com grelina (CG) mostrou aspecto semelhante ao grupo controle sem tratamento (C)

Figura 29. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos. Grupo controle tratado com grelina (CG). Hematoxiina-eosina (400X).



4.14.3 Grupo infectado sem tratamento (I)

Os cortes histológicos do coração dos animais do grupo infectado sem tratamento (I), no 150° dia da infecção, mostraram fibras desorganizadas e presença de células inflamatórias em várias áreas da musculatura cardíaca. Não foram encontrados ninhos de amastigotas nos cortes histológicos examinados (Figura 22 A e B).

Figura 30. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de *T cruzi.* Grupo infectado sem tratamento (I), no 150° dia da infecção. Asecto histológico do coração (A e B). Hematoxilina eosina (400X).



4.14.4 Grupo infectado tratado com grelina (IG)

No coração dos animais infectados e tratados com grelina, as fibras cardíacas apresentaram-se bem constituídas, sem processo inflamatório (Figura 31 A e B). Também não foram observados parasitas na musculatura cardíaca dos animais infectados tratados com grelina.

Figura 31. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de *T cruzi* e tratados com grelina (IG), no 150° dia da infecção. Aspecto histológico do coração (A e B). Hematoxilina eosina (400X). Notar ausência de parasitas na musculatura cardíaca.



4.14.5 Grupo infectado tratado com benzonidazol (IB)

O aspecto histológico do coração dos animais infectados e tratados com benzonidazol na fase crônica da infecção mostrou em algumas regiões fibras desorganizadas e ausência de ninhos de amastigotas (Figura 32 A e B).

Figura 32. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de *T cruzi* e tratados com benzonidazol (IB), no 150° dia da infecção. Aspecto histológico do coração (A e B). Hematoxilina eosina (400X).



4.14.6 Grupo infectado tratado com grelina e benzonidazol (IGB)

Os animais infectados e tratados com a associação dos fármacos (grelina e benzonidazol) apresentaram fibras bem constituídas, sem processo inflamatório. Também não foram observados parasitas na musculatura cardíaca nos animais tratados com associação de grelina e benzonidazol (Figura 33 A e B).

Figura 33. Fotomicrografia de cortes histológicos do coração de ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de *T cruzi* e tratados com grelina e benzonidazol (IBG), no 150° dia da infecção. Aspecto histológico do coração (A e B). Hematoxilina eosina (400X).



4.15 PCR do coração

A região determinada pelos primers S35/S36 foi amplificada na maioria das amostras infectadas. Os controles não infectados não apresentaram bandas além dos dímeros de primers (Figura 34). Das amostras analisadas, apenas uma do grupo infectado e duas do grupo infectado e tratado com grelina/benzonidazol não apresentaram bandas (Figura 34, setas).

Figura 34. Detecção de *T. cruzi* em amostras cardíacas. A sequência S36 foi amplificada por PCR utilizando os primers S35 (5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATG) e S36 (5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTG). O DNA foi visualizado sob luz ultra violeta, após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL). C = controle não infectado/não tratado; I = infectado; CG = controle tratado com grelina; IG = infectado e tratado com grelina; IB = infectado e tratado com benzonidazol; IGB = infectado e tratado com grelina e benzonidazol. As setas indicam os fragmentos S35/S36 (330 pb) amplificados.



Discussão

5 – Discussão

A terapia clássica para pacientes com a doença de Chagas limita-se à apenas duas drogas: Nirfurtimox e Benzonidazol. Esses medicamentos apresentam eficácia limitada na fase crônica e elevadas taxas de efeitos colaterais (ANDRADE et al., 2011; MORILLO et al., 2015; WHO, 2016). Assim, a busca por novas terapias e os estudos de moléculas que modulam a resposta imunológica se faz necessária e tem sido o alvo de estudo do nosso grupo de pesquisa (DA COSTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; DA COSTA et al., 2018).

Segundo critérios clínicos, a fase indeterminada da DC é relacionada a ausência de sintomas de insuficiência cardíaca, eletrocardiograma e radiografia torácica normais. Nas fases iniciais do envolvimento cardíaco, anormalidades segmentares de movimentação nas paredes ínfero-lateral e ínfero-basal do ventrículo esquerdo são encontradas, variando desde hipocinesia, acinesia até a formação de aneurismas (ANDRADE, 2011). A fração de ejeção e de encurtamento, índices que avaliam a função sistólica do ventrículo esquerdo, apresentam redução progressiva dos seus valores à medida que a doença evolui, conferindo pior prognóstico (PEREIRA, 2011).

A Doença de Chagas pode levar também a prejuízo na função diastólica, que pode ocorrer nas fases iniciais da doença. A progressão da doença resulta em redução da complacência ventricular e elevações nas pressões de enchimento (NASCIMENTO et al., 2013). Em alguns estudos, a prevalência de disfunção diastólica variou de 10% na forma indeterminada a 100% em pacientes com a forma cardíaca e com insuficiência cardíaca (BARROS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2013). Já em outros trabalhos publicados envolvendo pacientes na forma indeterminada da doença,

não foi observada nenhuma evidência de queda no desempenho diastólico (BARBOSA et al., 2014; PAZIN-FILHO et al., 2007).

O uso de técnicas mais sofisticadas para avaliação do desempenho sistólico segmentar do ventrículo esquerdo, como a técnica de rastreamento de pontos (speckle tracking), têm se apresentado de modo promissor, sendo possível detectar de maneira precoce redução da contratilidade, ajudando na identificação dos pacientes que apresentam maior risco de insuficiência cardíaca (BARBOSA et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram total preservação das funções sistólica e diastólica em todos os grupos estudados, demonstrando que a infecção não produziu alterações morfológicas e funcionais no coração dos ratos, levando-nos a inferir, sob as variáveis estudadas, que os animais infectados se encontravam provavelmente na fase indeterminada da doença.

Apesar da presença de *T. cruzi* nos tecidos e no sangue ser facilmente detectada na fase aguda da infecção, na fase crônica a identificação direta do parasita por métodos convencionais é limitada. Entretanto, técnicas moleculares de amplificação do DNA do parasita permitem demonstrar a presença de *T. cruzi* nos tecidos e nas lesões cardíacas de animais e de pacientes com infecção crônica (JONES et al., 1993).

No presente trabalho, apesar da ausência de parasitismo sanguíneo e tecidual nas amostras de tecido cardíaco analisadas por histologia, o DNA genômico de *T. cruzi* foi detectado em todas as amostras dos grupos infectados crônicos após PCR. Para quantificação do parasitismo tecidual, faz-se necessário em estudos porteriores a realização de PCR real time. Vários autores demonstraram que infiltrados de células mononucleares podem ser detectadas no tecido cardíaco de indivíduos e de roedores nas fases aguda e crônica da doença de Chagas (ANDRADE, 2000). Nos infiltrados inflamatórios predominam linfócitos T, principalmente células TCD8⁺, e também linfócitos TCD4⁺ e macrófagos (SUN & TARLETON, 1993; TARLETON, 1995; MARTIN & TARLETON, 2005). Nos animais infectados e tratados com grelina e/ou benzonidazol, não foram detectadas no estudo histopatológico alterações estruturais e/ou infiltrado inflamatório em nenhum dos corações estudados.

Somado a normalidade dos parâmetros ecocardiográficos, e de modo a ratificá-los dentro do contexto presumido, as dosagens séricas dos marcadores de lesão cardíaca (Troponina I e T) e congestão (NT-pro-BNP), assim como o estudo histopatológico, não demonstraram indícios de lesão cardíaca, à despeito da identificação do DNA genômico do parasita no miocárdio dos animais dos grupos infectados. Tal informação nos permite analisar a resposta imune sob um cenário clínico de ausência de lesão cardíaca detectável pelos métodos diagnósticos empregados.

Embora os mecanismos da resposta imune na doença de Chagas ainda não estejam completamente elucidados, estudos indicam o envolvimento de linfócitos T associados à alta produção de IFN-γ (SOARES *et al.*, 2001). Estudos também mostraram que pacientes que progrediram para a forma crônica mais grave da doença apresentavam altos níveis séricos de IFN-γ (GOMES *et al.*, 2003).

Os macrófagos, por sua vez, constituem uma população celular de grande importância encontrada nos sítios inflamatórios e são ativados por IFN- γ e TNF- α , citocinas super expressas, como demonstrado em corações de camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi* (SOARES et al., 2010). Nosso trabalho mostrou

que os animais infectados com *T. cruzi* e tratados com grelina e/ou benzonidazol não apresentaram diferenças estatisticamente significantes no percentual de macrófagos peritoneais e macrófagos RT1B⁺ quando comparados aos animais infectados sem tratamento. De forma semelhante, as dosagens das citocinas IFN- γ e TNF- α também não mostraram diferenças entre os grupos tratados e sem tratamento.

Estudos realizados em modelos animais mostraram que durante a fase crônica da doença existe uma expansão das populações de células TCD4⁺ e TCD8⁺ (TARLETON et al., 2015). Em nossos resultados, não observamos alterações nos percentuais de linfócitos nos diferentes grupos estudados. Considerando a fase da doença presumida pelo estudo ecocardiográfico e dosagem de biomarcadores séricos de lesão e congestão, não seria esperado, de acordo com literatura vigente e fisiopatogenia da doença, presença de resposta inflamatória intensa detectada nos grupos estudados.

As células NK e NKT são importantes no início da infecção, uma vez que constituem a maior fonte de IFN-γ, citocina que ativa macrófagos e induz a produção de óxido nítrico (BASSO et al., 2013). O presente estudo mostrou que, na fase crônica da infecção, a percentagem de células NK e NKT foi reduzida nos grupos infectado tratado com grelina (IG) e infectado tratado com ambos os fármacos (IGB), quando comparados ao grupo infectado (I). Tal resultado indica, que mesmo na fase indeterminada da doença, a grelina pode atenuar a atividade pró-inflamatória reduzindo as população de célular NK e NKT, importantes componentes relacionados ao dano tecidual de origem inflamatória.

Dentre as grandes mudanças que ocorrem no sistema imunológico, a infecção com *T. cruzi* leva à ativação de linfócitos policionais (MINOPRIO et al., 1989) e promovem a apoptose das células T (WELSH & MCNALLY, 1999). Além disso, os

antígenos liberados por *T. cruzi* também induzem apoptose linfocitária (LEGUIZAMÓN et al., 1999; MARAÑÓN et al., 2000; TARLETON et al., 2015).

Nossos resultados demonstraram que a administração de grelina na fase crônica da infecção, isolada, ou associada com benzonidazol, apresentou importante redução com significância estatística no porcentual de apoptose inicial e tardia em células esplênicas de animais infectados com *T. cruzi*. De forma coerente, houve aumento expressivo no percentual de células viáveis nos animais tratados com grelina em relação ao grupo infectado não tratado.

Estudos *in vitro* mostraram que a grelina inibe a apoptose em cardiomiócitos, células endoteliais, adipócitos, células da zona glomerulosa adrenal, células β pancreáticas, células osteoblásticas MC3T3-E1, células epiteliais intestinais e neurônios hipotalâmicos (BALDANZI et al., 2002). Além disso, a grelina possui efeito direto na diminuição da fibrose cística, equilibrando as respostas imunológicas inata e adquirida, sobretudo na regulação de citocinas pró-inflamatórias (ZHAN et al, 2008). Um estudo recente mostrou que a incubação de macrófagos alveolares com grelina inibiu a apoptose induzida por LPS. Segundo os autores, o efeito antiapoptótico da grelina sobre essas células provavelmente é mediado pelo receptor de GHSR (BIN et al., 2015).

Com base nos resultados encontrados, foi possível observar de modo inédito, maior taxa de apoptose em esplenócitos nos animais com infecção por *T. cruzi* e substancial redução do evento em animais tratados com grelina, demonstrando o potencial desse substância no cenário da infecção chagásica crônica. Tal achado sugere a necessidade de que estudos posteriores sejam realizados em modelo experimental com lesão cardíaca bem estabelecida, avaliando o potencial da grelina em reduzir a apoptose de cardiomiócitos *in vivo* e *in vitro*, assim como a compreensão dos mecanismos antiapoptóticos envolvidos. Nossas análises de citocinas no soro dos ratos, na fase crônica da infecção, mostraram um aumento significativo na concentração de IL-12 no grupo infectado tratado com grelina quando comparado ao grupo infectado sem tratamento. As demais citocinas avaliadas não apresentaram alterações significantes.

O papel da IL-12 no controle da infecção por *T. cruzi in vivo* foi demonstrado em camundongos infectados tratados com anticorpo monoclonal (mAb) anti-IL-12. Os autores demonstraram que a parasitemia e a mortalidade dos camundongos tratados com mAb anti-IL-12 foi maior quando comparados aos camundongos controles (SILVA et al., 1998). Em humanos, a infecção por *T. cruzi* leva à alta produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12. A produção dominante de IFN- γ e TNF- α está relacionada às lesões cardíacas da CCC humana. A presença de *T. cruzi* fornece um estímulo persistente para a produção de IL-12 levando ao padrão inflamatório tipo Th1 durante a fase crônica (ALIBERTI et al, 1996). Embora os modelos murino e humano compartilhem mecanismos imunológicos semelhantes, o padrão de citocinas inflamatórias associado ao agravamento da doença é distinto. Nossos resultados mostraram um aumento significativo da IL-12 sérica de animais infectados e tratados com grelina, possivelmente sem relação direta com o quadro clínico encontrado.

Como limitações, o presente trabalho avaliou o curso da doença na fase crônica num cenário de ausência de lesões típicas da forma cardíaca, assim como resposta imunológica não evidenciando status pró-inflamatório, o que pode não refletir o potencial da grelina em atuar sobre um cenário clínico e imunológico mais adversos. O uso de ratos Wistar como modelo experimental não provou-se adequado para produção do fenótipo clínico e inflamatório da doença no decorrer de 150 após a infecção com cepa Y de *T. cruzi*.
Conclusão

_

6- Conclusão

O uso da grelina em animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* na fase crônica demonstrou importante atividade antiapoptótica em esplenócitos e reduziu o número de células NK e NKT, relacionadas a resposte imune inata, sugerindo atividade anti-inflamatória nos animais tratados. Não foi possível avaliar os benefícios relacionados a cardioproteção da grelina em razão da ausência de lesão cardíaca detectável. Estudos adicionais devem ser realizados com modelo experimental mais susceptível às lesões de interesse.

Referências Bibliográficas

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. Imunidade Celular e Molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science/Taylor & Francis LLC, 2002.

Aliberti J. C. S.; Cardoso M. A. G.; Martins, G. A.; Gazzinelli, R. T.; Vieira, L. Q.; Silva J. S. (1996). 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.

Andrade, J. P.; Marin-Neto, J. A.; Paola, A. A. V.; Vilas-Boas, F.; Oliveira, G. M. M.; Bacal, F.; Bocchi, E. A.; Almeida, D. R.; Fragata Filho, A. A.; Moreira, M. C. V.; Xavier, S. S.; Oliveira Junior, W. A.; Dias, J. C. P. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 97, p. 01-48, 2011.

Andrade, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2 ed, Guanabara Koogan, 2000.

Andrade, Z.A.; Andrade, S.G. The pathology of Chagas' disease (cardiac chronic form). Bol Fund G Moniz, v.6, p.1–53, 1955.

Andrade, Z.A.; Andrade, S.G.; Correa, R.; Sadigursky, M.; Ferrans, V.J. Myocardial changes in acute Trypanosoma cruzi infection: ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. American Journal Pathology,v.144, n. 06, p.1403-11, 1994.

Baldanzi, G.; Filigheddu, N.; Cutrupi, S.; Catapano, F.; Bonissoni, S.; Fubini, A.; Malan, D.; Baj, G.; Granata, R.; Broglio, F.; Papotti, M.; Surico, N.; Bussolino, F.; Isgaard, J.; Deghenghi, R.; Sinigaglia, F.; Prat, M.; Muccioli, G.; Ghigo, E.; Graziani, A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. The Journal of cell biology, v. 159, p. 1029–1037, 2002

Barbosa, M.M.; Costa Rocha, M.O.; Vidigal, D.F.; Bicalho Carneiro R. C.; Araujo, R. D.;Palma, M. C.; Lins de Barros, M. V.; Nunes, M. C. Early Detection od Left Ventricular Contractility Abnormalities by Two-Dimensional Speckle Tracking Strain in Chagas' Disease. Echocardiography, V.31, p. 623–630, 2013.

Barros, M.V.; Machado, F. S.; Ribeiro, A.L.; Rocha, M. O. Diastolic function in chagas disease: an echo and tissue Doppler image study. European Journal of Echocardiogram, v.5, p. 182-8, 2004.

Basquiera, A. L.; Capra, R.; Omelianiuk, M.; Amuchástegui, M.; Madoery, R. J.; Salomone, O. A. Serum Troponin T in Patients With Chronic Chagas Disease. Revista Española de Cardiología (English Version), v. 56, n. 07, p. 742-744, 2003.

Basso, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. World Journal of Experimental Medicine, v.3, p.1-10, 2013.

Beiras-Fernandez, A.; Kreth, S.; Weis, F.; Ledderose, C.; Pöttinger, T.; Dieguez, C.; Beiras, A.; Reichart, B. Altered myocardial expression of ghrelin and its receptor (GHSR-1a) in patients with severe heart failure. Peptides, v. 31, n. 12, p. 2222-2228, 2010.

Benchimol, J. L.; Silva, A. F. C. Rfirailroads, disease, and tropical medicine in Brazil under the first Replublic. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, v. 15, n. 3, p. 719-762, 2008.

Bern, C. Chagas disease. New England Journal Medicine, v.373, p.456–66, 2015.

Bern, C.; Montgomery, S.P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 49, n. 5, p.52–4, 2009.

Bonney, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? Parasite, v. 21, p. 11, 2014.

Brazão, V.; Filipin, M. del V.; Santello, F. H.; Azevedo, A. P.; Toldo, M. P.; de Morais, F. R.; do Prado, J. C. Immunomodulatory properties and anti-apoptotic effects of zinc and melatonin in an experimental model of chronic Chagas disease. Immunobiology, v. 220, n. 5, p. 626-33, 2015.

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 4, p. 389-96, 1962.

Burnet, F.M. Immunological surveillance in neoplasia. Plant, v. 7, n.163, p. 3–25, 1971.

Cao, Y.; Tang, J.; Yang, T.; Ma, H.; YI, D.; GU, C.; YU, S. Cardioprotective effect of ghrelin in cardiopulmonary bypass involves a reduction in inflammatory response. PLoS ONE, v. 8, n. 1, p. e55021, 2013.

Cardoso, C.S.; Ribeiro, A.L.P.; Oliveira, C.D.L.; Oliveira, L.; Ferreira, A.M.; Bierrenbach, A.L. et al. Beneficial effects of benznidazole in Chagasdisease: NIH SaMi-Trop cohort study. PLoS Neglected Tropical Disease, v. 12, n. 11, p. 1-12, 2018.

Ceballos, L.A.; Cardinal, M.V.; Vazquez-Prokopec, G.M.; Lauricella, M.A.; Orozco, M.M.; Cortinas, R.; Schijman, A.G.; Levin, M.J.; Kitron, U.; Gurtler, R.E. Long-term reduction of *Trypanosoma cruzi* infection in sylvatic mammals following deflorestation and sustained vector surveillance in northwestern Argentina. Acta Tropica, v. 98: p. 286-296, 2006.

Chagas, C. Neue Trypanosomen. Archiv für Schiffs-und Tropenhygiene, v. 13, p. 120, 1909a.

Chagas, C. Novo Tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Memória Instituto Oswaldo Cruz, v. 1(2), p.159-218, 1909.

Chagas, C. Trypanosoma minasense. Nota preliminar. Brazil-Medico, v. 22, n. 48, p. 471, 1908.

Chang, L.; Ren, Y.; Liu, X.; Li, W. G.; Yang, J.; Geng, B.; Weintraub, N. L.; Tang, C. Protective Effects of Ghrelin on Ischemia/Reperfusion Injury in the Isolated Rat Heart. Journal of Cardiovascular Pharmacology, v. 43, n. 2, p. 165-170, 2004.

Chorny, A.; Anderson, P.; Gonzalez-Rey, E.; Delgado, M. Ghrelin protects against experimental sepsis by inhibiting high-mobility group box 1 release and by killing bacteria. Journal of Immunology, v. 180, p. 8369–8377, 2008.

Coura, J.R.; Junqueira, A.C.V.; Fernandes, O.; Valente, S.A.S.; Miles, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends in Parasitology, v. 18, p. 171-176, 2002.

Da Costa, C. M.; Brazão, V.; Collins Kuehn, C.; Rodrigues Oliveira, L. G.; do Prado Júnior, J. C.; Sala, M. A.; Carraro Abrahão, A. A. Zinc and pregnancy: markedchanges on the immune response following zinc therapy for pregnant femaleschallenged with *Trypanosoma cruzi*. Clinical Nutrition., v. 32, p. 592-598, 2013.

da Costa, C. M.; de Freitas, M. R.; Brazão, V.; dos Santos, C. D.; Sala, M. A.; do Prado Júnior, J. C.; Abrahão, A. A.. Does L-arginine availability during the early pregnancy alters the immune response of *Trypanosoma cruzi* infected and pregnant Wistar rats? Experimental Parasitology, v.142, p.59-66, 2014.

Da Costa, C.M.B.; Filipin, M. D. V.; Santello, F. H.; Pereira, L. M.; Toldo.; Do Prado Júnior, J.C.; Carraro-Abrahão, A. A. Is the adaptive immune response in murine *Trypanosoma cruzi* infection influenced by zinc supplementation? European Journal of Pharmaceutical Science, v.111, p.330-336, 2018.

De Pablos, L. M.; Gonzáles, G. G.; Parada, J. S.; Hidalgo, V. S.; Lozano, I. M. D.; Samblás, M. M. G.; Bustos, T. C.; Osuna, A. Differential Expression and Characterization of a Member of the Mucin-Associated Surface Protein Family Secreted by *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity, v. 79, p. 3993-4001, 2011.

De Pablos, L. M.; Osuna, A. Conserved Regions as Markers of Different Patterns of Expression and Distribution of the Mucin-Associated Surface Proteins of *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity, v. 80, p. 169-174, 2012.

Diniz, L. D. F.; Urbina, J. A.; DE Andrade, I. M.; Mazzeti, A. L.; Martins, T. A. F.; Caldas, I. S.; Talvani, A.; Ribeiro, I.; Bahia, M. T. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas Disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

Ferreira, V.; Valck, C.; Sanchez, G.; Gingras, A.; Tzima, S.; Molina, M. C. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. Journal of Immunology, V. 172, p. 3042–3050, 2004.

Garcia, G. A. O papel da resistência a inseticidas e da densidade de *Aedes aegypti* na disseminação da Wolbachia em populações nativas do Rio de Janeiro, Brasil. 2017. 303f. Tese (Doutorado em biologia parasitária)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

Gomes, J.A.; Bahia-Oliveira, L.M.; Rocha, M.O.; Martins-Filho, O.A.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infection Immunology, v.71, p.1185-93, 2003.

Gonzalez-Rey, E.; Chorny, A.; Delgado, M. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. Gastroenterology, v. 130, p. 1707–1720, 2006.

Granata, R.; Isgarrd, J.; Alloati, G.; Ghigo, E. Cardiovascular actions of the ghrelin gene-derived peptides and growth hormone-releasing hormone. Experimental Biology and Medicine, v. 236, n. 5, p. 505-514, 2011.

Higuchi, M.L.; Benvenuti, L.A.; Reis, M.M.; Metzger, M. Pathophysiology of the heart in Chagas` disease: current status and new developments. Cardiovascular Research, v.60, p.96-107, 2003.

Higuchi, M.L.; Benvenuti, L.A.; Reis, M.M.; Metzger, M. Pathophysiology of the heart in Chagas` disease: current status and new developments. Cardiovascular Research, v. 60, n. 1, p. 96-107, 2003.

Iglesias, M. J.; Piñeiro, R.; Blanco, M.; Gallego, R.; Dieguez, C.; Gualillo, O.; González-Juanatey, J. R.; Lago, F. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. Cardiovascular Research, v. 62, n. 3, p. 481-488, 2004.

Iseri, S.O.; Sener, G.; Saglam, B.; Ercan, F.; Gedik, N.; Yegen, B.C. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. Regulatory peptides, v. 146, p. 73–79, 2008.

Jones, E.M.; Colley, D.G.; Tostes, S.J.; Lopes, E.R.; Vnencak-Jones, C.L.; McCurley, T.L. 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.8, n.3, p. 348-357.

Junqueira, C.; Caetano, B.; Bartholomeu, D. C.; Melo, M. B.; Ropert, C.; Rodrigues, M. M.; Gazzinelli, R. T. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. Expert Reviews in Molecular Medicine, v. 12, p. e29, Sep 15 2010. ISSN 1462-3994.

Köberle F. Chagas' heart disease and Chagas' syndromes: the pathology of american trypanosomiasis. Advances in Parasitology, v. 6, p. 63-116, 1968.

Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature, v. 402, n. 6762, p. 656-60, 1999.

Korbonits, M.; Goldstone, A. P.; Gueorguiev, M.; Grossman, A. B. Ghrelin—a hormone with multiple functions. Frontiers in Neuroendocrinology, v. 25, n. 1, p. 27-68, 2004.

Lang R. M.; Badano, L. P.; Mor-Avi, V.; Afilalo, J.; Armstrong, A.; Ernande, L.; Flachskampf, F. A.; Foster, E.; Goldstein, S. A.; Kuznetsova, T.; Lancellotti, P.; Muraru, D.; Picard, M. H.; Rietzschel, E. R.; Rudski, L.; Spencer, K. T.; Tsang, W.; Voigt, J. U. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: An update from the American Society of Echocardiography and European Association of Cardiovascular Imaging. Journal of American Society of Echocardiography, v. 28, p. 1 - 39, 2015.

Ledderose, C.; Kreth, S.; Beiras-Fernandez, A. Ghrelin, A Novel Peptide Hormone in the Regulation of Energy Balance and Cardiovascular Function. Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2011.

Lee, B.Y.; Bacon K.M.; Bottazzi, M.E.; Hotez P.J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. Lancet Infection Diseases, v. 13(4), p. 342-8, 2013.

Leguizamón, M. S.; Mocett, E.; Garcia Rivello, H.; Argibay, P.; Campantella, O. Transsialidase from *Trypanosoma cruzi* apoptosis in cells from the immune system in vivo. Journal of Infection Diseases, v. 180, 1398-1402, 1999.

Li, B.; Zeng, M.; He, W.; Huang, X.; Luo, L.; Zhang, H.; Deng, D. Y. B. Ghrelin Protects Alveolar Macrophages Against Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis Through Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a-Dependent c-Jun N-Terminal Kinase and Wnt/β-Catenin Signaling and Suppresses Lung Inflammation, *Endocrinology*, v. 156, p. 203–217, 2015.

Li, W.G.; Gavrila, D.; Liu, X.; Wang, L.; Gunnlaugsson, S.; Stoll, L.L.; McCormick, M.L.; Sigmund, C.D.; Tang, C.; Weintraub, N.L. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. Circulation, v. 109, p. 2221–2226, 2004.

Marañón, C.; Planelles, L.; Alonso, C.; López, M. C. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. International immunology, v. 12, p. 1685-1693, 2000.

Marin-Neto, J.A.; Cunha-Neto, E.; Maciel, B.C.; Simões, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation, v. 115, n. 9, p. 1109-23, 2007.

Martin, D. L.; Tarleton, R. L. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. Journal of Immunology, v.174, p.1594-601, 2005.

Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

Minoprio, P.; Itohara, S.; Heusser, C.; Tonegawa, S.; Coutinho, A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. Immunology Reviews, v. 112, p. 183-207, 1989.

Morillo, C.A.; Marin-Neto, J. A.; Avezum A, et al.; BENEFIT Investigators. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. New England Journal of Medicine, v. 373, p.1295–306, 2015.

Nagajyothi, F.; Machado, F. S.; Burleigh, B. A.; Jelicks, L. A.; Scherer, P. E.; Mukherjee, S.; Lisanti, M. P.; Weiss, L. M.; Garg, N. J.; Tanowitz, H. B. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. Cell Microbiology, v.14, p. 634–643, 2012.

Nagaya, N.; Uematsu, M.; Kojim, M.; Ikeda, Y.; Yoshihara, F. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. Circulation, v. 104, p. 1430-1435, 2001

Nascimento, C.A.; Gomes, V.A.; Santos, C.R.; Chambela, M.C.; Madeira, F.S.; Holanda, M. T.; Brasil, P. E.; Sousa, A. S.; Xavier, S. S.; Hasslocher-Moreno, A. M.; Cunha, A. B.; Saraiva, R. M. Left atrial and left ventricular diastolic function in chronic Chagas disease. Journal of the American Society of Echocardiography, v. 26, p. 1424-33, 2013.

Norris, K. A.; Schrimpf, J. E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. Infection Immunology. v. 62, p. 236–243, 1994.

Nunes, M.P.; Colosimo, E.A.; Reis, R.C.; Barbosa, M.M.; Silva, J.L.; Barbosa, F.; Botoni, F. A.; Ribeiro, A. L.; Rocha, M. O. Different prognostic impact of the tissue Doppler-derived E/e' ratio on mortality in Chagas cardiomyopathy patients with heart failure. Journal of Heart and Lung Transplant, v. 36, p.634-41, 2012.

of PKA and Akt. Cardiovascular Toxicology, 2019

Palma, M. C.; Lins de Barros, M. V.; Nunes, M. C. Early detection of left ventricular contractility abnormalities by two-dimensional speckle tracking strain in chagas' disease. Echocardiography, v. 31, p. 31:623–30, 2014.

Palma, M. C.; Lins de Barros, M. V.; Nunes, M. C. Early Detection od Left Ventricular Contractility Abnormalities by Two-Dimensional Speckle Tracking Strain in Chagas' Disease. Echocardiography, V.31, p. 623–630, 2013.

Pazin-Filho, A.; Romano, M.M.D.; Furtado, R. G.; de Almeida Filho, O. C.; Schmidt, A.; Marin-Neto, J. A.; Maciel, B. C. Left ventricular global performance and diastolic function in indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease. Journal of the American Society of Echocardiography, v.20(12), p.1338–43, 2007.

Pereira Nunes, M. C.; Barbosa, M. M.; Ribeiro, A. L.; Amorim Fenelon, L. M.; Rocha, M. O. Factores predictivos de la mortalidad en pacientes con miocardiopatía dilatada: importancia de la enfermedad de Chagas como etiología. Revista Espanola de Cardiologia, v. 63, n. 7, p. 788-97, 2010.

Pereira, R. Aspectos Ecodopplercardiográficos na Doença de Chagas. Revista Brasileira de Imagem Cardiovascular, v. 24, n. 3, p. 84-88, 2011.

Rahman, A.; Broadley, S. A. Review article: Elevated troponin: Diagnostic gold or fool's gold? Emergency Medicine Australasia, v. 26, p. 125-130, 2014.

Rassi Jr, A.; Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infection Disease Clinical North America, v .26, p.275–91, 2012.

Rassi, A.; Rassi Jr, A.; Marin-Neto, J. A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. Memórias do Institudo Oswaldo Cruz, v. 112, n. 3, p. 224-235, 2017.

Schmunis, G.H. The globalization of Chagas disease. ISBT Science Series, v. 2, n. 1, p. 6-11, 2007.

Sharma, V.; Mcneill, J. H. The Emerging Roles of Leptin and Ghrelin in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. Current Vascular Pharmacology, v. 3, n. 2, p. 169-180, 2005.

Shati, A.A.; Dallak, M. Acylated Ghrelin Protects the Hearts of Rats from Doxorubicin-Induced Fas/FasL Apoptosis by Stimulating SERCA2a Mediated by Activation

Silva, J. S.; Aliberti, J. C.; Martins, G. A.; Souza, M. A.; Souto, J. T.; Pádua, M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res, v. 31, n. 1, p. 111-115, 1998.

Silva, L.H.P.; *Nussenzweig*, V. Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clínica et Biológica, v. 20, p.191-201, *1953.*

Silverstein, A. M. A History of Immunology. Second edition. Amsterdam: Elsevier, 2009.

Smith, R.; Leonard, R.; Bailey, A. T.; Palyha, O.; Feighner, S.; Tan, C.; Mckee, K.; Pong, S. S.; Griffin, P.; Howard, A. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. Endocrine, v. 14, n. 1, p. 9-14, 2001.

Soares, M.B.; de Lima, R.S.; Rocha, L.L.; Vasconcelos, J.F.; Rogatto, S.R.; dos Santos, R.R.; Iacobas, S.; Goldenberg, R.C.; Iacobas, D.A.; Tanowitz, H.B.; de Carvalho, A.C.; Spray, D.C. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. Journal of Infection Diseases, v. 202, p. 416e426, 2010.

Soares, M.B.; Pontes-De-Carvalho, L.; Ribeiro-Dos-Santos, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, v. 73 p. 547e559, 2001.

Stevrding, D. The history of African trypanosomiasis. Parasite & Vectors, v. 1, n. 1, p. 3, 2008.

Sun, J.; Tarleton, R.L. 1993. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *T. cruzi* infection. American Journal Tropical Medicine Hygiene, v. 48, p.161-169.

Talvani, A; Rocha, M.O.; Ribeiro, A.L.; Borda, E.; Sterin-Borda, L.; Teixeira, M.M. Levels of anti-M2 and anti-b1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. Microbes Infection, v. 8, n. 9-10, p.2459-64, 2006.

Tarleton, R. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Semin Immunopathol, v.37, p.233-8, 2015.

Tarleton, R.L. 1995. The role of T cells in Trypanosoma cruzi infections. Parasitology Today, v.11, p.7-9, 1995.

Vianna, E. N.; Souza e Guimarães, R. J. de P.; Souza, C. R.; Gorla, D.; Diotaiuti, L. (2017). Chagas disease ecoepidemiology and environmental changes in northern Minas Gerais state, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 112(11), p. 760-768, 2017.

Welsh, R. M.; McNally, J. M. Immune deficiency, immune silencing and clonal exhaustion of T cell responses during viral infections. Current Opinon Microbiology; v. 2, p. 382-387, 1999.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) http://www.who.int/chagas/disease/en/, 2016.

Zhang, G. G.; Teng, X.; Liu, Y.; Cai, Y.; Zhou, Y.-B.; Duan, X.-H.; Song, J.-Q.; Shi, Y.; Tang, C.-S.; Yin, X.-H.; Qi, Y.-F. Inhibition of endoplasm reticulum stress by ghrelin protects against ischemia/reperfusion injury in rat heart. Peptides, v. 30, n. 6, p. 1109-1116, 2009.

Zhang, G.; Yin, X.; Qi, Y.; Pendyala, L.; Chen, J.; Hou, D. Ghrelin and cardiovascular disease. Current Cardiology Reviews, v.6, p. 62-70, 2010.