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.

1. 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:

Banca Examinadora

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

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

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

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

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

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

“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 tratamento com o benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-acetamida), 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 10^5 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 10^5 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 10^5 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 ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 46

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..... 47

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)..... 51

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)..... 52

Figura 16. Marcação de células do baço com Anexina V e Iodeto 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)..... 54

Figura 17. Marcação de células do baço com Anexina V e Iodeto 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)..... 56

Figura 18. Marcação de células do baço com Anexina V e Iodeto 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)..... 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-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 59

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)..... 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-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 61

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)..... 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-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 63

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 (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)..... 64

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-way ANOVA e Bonferroni's multiple comparison posttests)..... 65

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

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..... 72

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 (A e B). Hematoxilina eosina (400X)..... 73

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..... 74

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:

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..... 42

Tabela 7. Parâmetros ecocardiográficos do estudo doppler pulsado e tecidual com média e desvio padrão aos 150 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..... 43

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 Iodeto 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-α 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..... x
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 MATERIAL E MÉTODOS..... 18
3.1 Animais..... 19
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 fluxo..... 28
3.10 Preparo da suspensão celular do baço e análise fenotípica por citometria de fluxo..... 29

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 iodeto de propídeo..... 32
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 por citometria de fluxo 44
4.4 Macrófagos RT1B⁺..... 46
4.5 Análise das subpopulações de linfócitos CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD8⁺..... 47
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 cultura (24horas,sem estímulo)..... 55
4.11 Análise do perfil de apoptose e viabilidade celular em cultura (24 horas, extrato parasitário..... 57
4.12 Dosagem das Citocinas – IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α , IFN-γ e TGF-β..... 59
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

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 INF-γ 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 NT-pro-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.

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. Trans-sialidase 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.