

**Consequências do hipotireoidismo na doença de Chagas  
experimental**

**Pedro Alexandre Sampaio Oliveira**

**Ribeirão Preto  
2022**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Consequências do hipotireoidismo na doença de Chagas  
experimental**

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

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

**Orientado: Pedro Alexandre Sampaio Oliveira**

**Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior**

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 11/05/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Sampaio Oliveira, Pedro Alexandre  
Consequências do hipotireoidismo na doença de Chagas experimental. Ribeirão Preto, 2022  
100p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Do Prado Júnior, José Clóvis.

1. Doença de Chagas. 2. Hipotireoidismo. 3. Resposta Imune.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Pedro Alexandre Sampaio Oliveira

Consequências do hipotireoidismo na doença de Chagas experimental

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

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

***DEDICATÓRIA***

“Dedico este trabalho ao meu maior amor, Guiomar Souza Martins de Oliveira (in memoriam), sem o seu carinho desinteressado eu jamais chegaria até aqui.”

# ***AGRADECIMENTOS***

Ao meu Senhor e meu Deus, por todo amor e fidelidade.

Aos meus pais, Leuzimar Martins e Francisco Sampaio, por todo amor verdadeiro dedicado a mim. Sem vocês nada teria sentido.

Ao professor Dr. José Clóvis do Prado, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo carinho na orientação deste trabalho, serei eternamente grato. Obrigado por me ensinar a ser uma pessoa muito melhor.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP, que nunca mediram esforços para ajudar, contribuir e compartilhar conhecimento. Sem vocês este trabalho não existiria. Em especial a Amanda Goulart, Naira Anchieta, Gisele Bulhões, Maiara Providello, Vânia Brazão, Jefferson Luiz, Rafaela Pravato, Daiane Tezuka, Luís Balbierato, Bruna Possato e Mariana Bronzon.

Ao meu irmão Isaac Afonso por todo apoio e suporte.

Aos meus amigos e irmãos do MUR SP e da RCC Ribeirão Preto, vocês foram o meu suporte emocional e espiritual. Eterna gratidão.

Aos técnicos do Laboratório de Parasitologia da FCFRP, Georgius e Cristiana, que contribuíram de maneira fundamental para a execução deste trabalho.

Aos professores, secretários (Ana e Henrique, em especial) e técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, por todo conhecimento, gentileza e ajuda em todo o curso deste trabalho.

Aos meus amigos de Jaupaci-GO, Barra do Garças-MT e Ribeirão Preto-SP, por todo suporte neste tempo.

Aos meus familiares, família Sampaio Freire e Martins Oliveira, pela torcida e oração durante esta jornada.

A Fabiana Rossetto por toda ajuda na técnica de citometria de fluxo.



A Edna Barizon por todo auxílio com a dosagem hormonal.

Ao conhecimento adquirido na Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP-USP.

As agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP pelo suporte financeiro.

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

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

Sampaio Oliveira, P. A. **Consequências do hipotireoidismo na doença de Chagas experimental**. 2022. 100 f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

As disfunções da tireoide atingem aproximadamente 0,5 a 1% da população em geral, mas podem ser ainda mais frequentes em determinadas populações, como gestantes, idosos e indivíduos com comorbidades. Dentre as principais disfunções descritas, o hipotireoidismo destaca-se como a patologia de maior prevalência, e recentemente foi correlacionado a um perfil de suscetibilidade em infecções virais, bem como a alterações imunes e hematológicas importantes. Apesar do avanço científico nas últimas décadas para o entendimento da contribuição do sistema endócrino na modulação imune durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, a participação dos hormônios tireoidianos na doença de Chagas permanece incerta. Diante desse fato, no presente estudo, buscamos compreender quais as consequências da hipofunção tireoidiana na fase aguda da doença de Chagas experimental. Para isso, ratos *Wistar Hannover* foram submetidos ao tratamento com medicamento antitireoidiano (metimazol) por 21 dias. Após a confirmação do quadro de hipotireoidismo, os animais foram infectados por via intraperitoneal pelas formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e a parasitemia foi acompanhada no 7º e 9º dia de infecção. De modo interessante, descrevemos que a redução dos hormônios tireoidianos, promoveu um aumento da morte celular no timo dos animais infectados, com consequente desregulação na frequência de leucócitos circulantes, especialmente o aumento de neutrófilos e a diminuição de linfócitos. Um fato que fortalece a regulação positiva na porcentagem de células polimorfonucleares foi a elevada produção da quimiocina MIP-2 $\alpha$  encontrada no soro de animais hipotireoideos infectados, quando comparados aos apenas hipotireoideos. Ao investigar a frequência de células imunes no baço, encontramos um papel regulador negativo do hipotireoidismo na porcentagem de linfócitos B e células dendríticas durante a fase aguda da doença de Chagas. Embora a infecção por *T. cruzi* promova uma maior expressão de MHC II em macrófagos, o hipotireoidismo afetou negativamente a disponibilidade dessa molécula de ativação celular. Em parâmetros hematológicos, os nossos resultados demonstram que a doença de Chagas e hipotireoidismo em sinergismo, promovem uma diminuição significativa nos valores de plaquetas e eritrócitos, em comparação aos animais saudáveis. Ao avaliar a produção de citocinas plasmáticas, relatamos que a infecção por *T. cruzi* favoreceu a produção de mediadores inflamatórios, como IL-18 e IFN- $\gamma$ , de forma independente do hipotireoidismo. Entre os animais normotireoideos, a infecção promoveu maior produção de IL-17, porém, entre os hipotireoideos, valores similares desta citocina foram encontrados entre os animais infectados e não infectados, o que sugere interferência direta do hipotireoidismo na geração de IL-17 no curso da infecção chagásica. Em contrapartida, a hipofunção tireoidiana favoreceu a regulação de alguns parâmetros imunes investigados, como o aumento da expressão de CD11a em linfócitos T CD4, elevada produção de IL-10 em animais hipo infectados e maior frequência de células NK e NK T no baço dos animais. Assim, o conjunto dos dados aqui apresentados, contribuem de modo direto para o melhor entendimento sobre o impacto das disfunções tireoidianas na modulação imune em doenças parasitárias, com um importante enfoque nas consequências do hipotireoidismo nas fases iniciais da doença de Chagas experimental.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Hipotireoidismo, Resposta Imune

## ABSTRACT

Sampaio Oliveira, P. A. **Consequences of hypothyroidism in experimental Chagas disease.** 2022. 100 f. Tese. College of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Thyroid disorders affect approximately 0.5 to 1% of the general population, but may be even more frequent in certain populations, such as pregnant women, the elderly, and individuals with comorbidities. Among the main disorders described, hypothyroidism stands out as the most prevalent pathology, and has recently been correlated with a susceptibility profile in viral infections, as well as with important immune and hematological alterations. Despite scientific advances in recent decades in understanding the contribution of the endocrine system to immune modulation during *Trypanosoma cruzi* infection, the role of thyroid hormones in Chagas disease remains uncertain. In the present study, we evaluated the consequences of thyroid hypofunction during the acute phase of experimental Chagas disease. For this, Wistar Hannover rats were treated with an antithyroid drug (methimazole) for 21 days. After confirmation of hypothyroidism, the animals were infected intraperitoneally with the trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* and the parasitemia was monitored on the 7th and 9th day post infection. Interestingly, the reduction of thyroid hormones promoted an increase in thymocytes death of infected animals, with consequent dysregulation in the frequency of circulating leukocytes, especially increased neutrophils percentages and decreased lymphocytes percentages. A fact that strengthens the positive regulation in the percentage of polymorphonuclear cells was the high production of the chemokine MIP-2 $\alpha$  found in the serum of infected hypothyroid animals, when compared to only hypothyroid animals. By investigating the frequency of immune cells in the spleen, we found a negative regulatory role of hypothyroidism in the percentage of B lymphocytes and dendritic cells during the acute phase of Chagas disease. Although *T. cruzi* infection promotes greater expression of MHC II in macrophages, hypothyroidism negatively affected the availability of this cell activation marker. In hematological parameters, our results demonstrated that Chagas disease and hypothyroidism, in synergism, promote a significant decrease in platelet and erythrocyte values, compared to healthy animals. When evaluating plasma cytokine production, we reported that *T. cruzi* infection favored the production of inflammatory mediators, such as IL-18 and IFN- $\gamma$ , independently of hypothyroidism. Among normothyroid animals, the infection promoted enhanced production of IL-17. However, among hypothyroid animals, similar values of this cytokine were found between infected and non-infected animals, which suggests a direct interference of hypothyroidism in the generation of IL-17 in the course of chagasic infection. On the other hand, thyroid hypofunction favored the regulation of some investigated immune parameters, such as increased expression of CD11a in CD4 T lymphocytes, high production of IL-10 in hypo-infected animals and a higher frequency of NK and NK T cells in the spleen of animals. Thus, the set of data presented here directly contribute to a better understanding of the impact of thyroid dysfunctions on immune modulation in parasitic diseases, with an important focus on the consequences of hypothyroidism in the early stages of experimental Chagas disease.

Keys words: Chagas disease, Hypothyroidism, Immune Response

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalência global do hipotireoidismo .....	24
<b>Figura 2.</b> Efeito farmacológico do tratamento com metimazol em ratos .....	44
<b>Figura 3.</b> Análise de parasitemia .....	45
<b>Figura 4.</b> Consequência do hipotireoidismo na saúde dos órgãos durante a fase aguda da doença de Chagas .....	46
<b>Figura 5.</b> Impacto do hipotireoidismo em parâmetros hematológicos durante a fase aguda da doença de Chagas .....	47
<b>Figura 6.</b> Efeito do hipotireoidismo na contagem diferencial de células sanguíneas durante a fase aguda da doença de Chagas .....	48
<b>Figura 7.</b> Consequência do hipotireoidismo na modulação de quimiocinas e fatores de crescimento durante a fase aguda da doença de Chagas .....	50
<b>Figura 8.</b> Impacto do hipotireoidismo na contagem de células do baço e timo na fase aguda da doença de Chagas .....	52
<b>Figura 9.</b> Impacto do hipotireoidismo na maturação de linfócitos no timo durante a fase aguda da doença de Chagas.....	54
<b>Figura 10.</b> Influência do hipotireoidismo na frequência de linfócitos T no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.....	55
<b>Figura 11.</b> Influência do hipotireoidismo na ativação de linfócitos T no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.....	56
<b>Figura 12.</b> Impacto do hipotireoidismo na frequência de linfócitos B no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.....	57
<b>Figura 13.</b> Impacto do hipotireoidismo na frequência e ativação de macrófagos no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.....	59
<b>Figura 14.</b> Efeito do hipotireoidismo na frequência e ativação de células dendríticas no baço durante a fase aguda da doença de Chagas .....	60
<b>Figura 15.</b> Consequência do hipotireoidismo na modulação de citocinas durante a fase aguda da doença de Chagas – Parte 1 .....	62
<b>Figura 16.</b> Influência do hipotireoidismo na modulação de citocinas durante a fase aguda da doença de Chagas – Parte 2.....	63
<b>Figura 17.</b> Influência do hipotireoidismo na frequência de células NK, NK T e T reguladoras durante a fase aguda da doença de Chagas.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Grupos experimentais.....	34
<b>Tabela 2.</b> Anticorpos utilizados para fenotipagem de células do baço.....	36
<b>Tabela 3.</b> Anticorpos utilizados para fenotipagem de células do timo.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACK: Tampão de lise (*Ammonium-Chloride-Potassium*)
- ALT: Alanina aminotransferase
- APCs: Células apresentadoras de antígeno
- AST: Aspartato aminotransferase
- CCL5: *Chemokine (C-C motif) ligand 5*
- CD28: *Cluster of differentiation 28*
- CD11a: Integrina Alfa L
- CEUA: Comitê de Ética no uso de animais
- CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) ligand*
- CXCR: Receptor de quimiocina CXC
- DC: Doença de Chagas
- DCs: *Dendritic cells* (Células dendríticas)
- DN: Duplo negativo
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DNTs: Doenças tropicais negligenciadas
- DP: Duplo positivo
- ED-2: Glicoproteína CD163
- ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- Fc block: Bloqueador de ligações não específicas
- FCFRP-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
- Foxp3: *Forkhead box P3*
- G-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos
- GM-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
- h: Hora
- Hipo: Hipotireoideos
- Hipo infectado: Hipotireoideos infectados
- Ht: Hematócrito
- HTs: Hormônios tireoidianos
- IFN- $\gamma$ : Interferon gamma
- IgA: Imunoglobulina A
- IgE: Imunoglobulina E



IgG: Imunoglobulina G  
IgM: Imunoglobulina M  
IL-1 $\alpha$ : Interleucina 1 alfa  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta  
IL-2: Interleucina 2  
IL-4: Interleucina 4  
IL-6: Interleucina 6  
IL-10: Interleucina 10  
IL-12: Interleucina 12  
IL-12p70: Interleucina 12p70  
IL-17: Interleucina 17  
IL-18: Interleucina 18  
IL-23: Interleucina 23  
iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzida  
i.p.: Intraperitoneal  
LFA-1: Antígeno 1 associado à função linfocitária  
LPS: Lipopolissacarídeo  
L-T4: Levotiroxina  
MCP-1: *Monocyte Chemoattractant protein-1*  
MHC: Complexo de Histocompatibilidade  
MIP-1 $\alpha$ : Macrophage inflammatory protein 1 alpha  
MIP-2 $\alpha$ : Macrophage inflammatory protein 2 alpha  
mL: Mililitros  
mg: Miligramas  
MMI: *Methimazole* (Metimazol)  
MPO: Mieloperoxidase  
 $\mu$ g: Microgramas  
 $\mu$ L: Microlitros  
mm: Milímetros  
 $\mu$ M: Micromolar  
NK: Células Natural Killer  
NK T: Células Natural Killer T  
NO: Óxido Nítrico  
PBS: Tampão fosfato salino

pH: Potencial hidrogênionico  
PE: Ficoeritrina (r-phicoeritrin)  
PERCP: Complexo proteico clorofila-peridina (Peridin clorofil protein)  
pg: Picogramas  
PI: Iodeto de propídeo  
PRRs: *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento de padrões)  
ROS: *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)  
rpm: Rotações por minuto  
RPMI: Meio de cultura (Roswell park memorial institute)  
SBF: Soro bovino fetal  
TCR: Receptor de linfócito T  
*T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*  
TGF- $\beta$ : Fator de transformação de crescimento beta  
Th1: Células T helper 1  
Th2: Células T helper 2  
Th17: Células T helper 17  
TLRs: Receptor do tipo toll  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
T regs: Células T reguladoras  
TRH: Hormônios estimulante da tirotrofina  
TRs: Receptores do hormônio tireoidiano  
TSH: Hormônio estimulador da tireoide  
TSHr: Receptor do hormônio estimulador da tireoide  
T3: Triiodotironina  
T4: Tiroxina ou tetraiodotironina  
T4 livre: Tiroxina livre  
U.I.: Unidade Internacional  
WHO: World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	i
<b>Abstract</b>	iii
<b>Lista de figuras</b>	iv
<b>Lista de tabelas</b>	v
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	vi
1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 Doenças de Chagas.....	12
1.2 Doença de Chagas e o sistema imune .....	15
1.3 Hormônios da tireoide e o hipotireoidismo.....	20
1.4 Consequências dos hormônios tireoidianos no sistema imune.....	25
1.5 Indução do hipotireodismo em modelo animal por metimazol.....	28
2. OBJETIVOS .....	30
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos .....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
3.1 Animais .....	33
3.2 Tratamento com metimazol para indução do hipotireoidismo.....	33
3.3 Parasitos, infecção experimental e eutanásia.....	33
3.4 Grupos experimentais.....	34
3.5 Quantificação de parasitos.....	34
3.6 Peso relativo dos órgãos e ganho de peso semanal .....	34
3.7 Contagem diferencial .....	35
3.8 Preparação de tecidos e quantificação de células do baço e timo .....	35
3.9 Fenotipagem de células por citometria de fluxo.....	35
3.10 Caracterização de células T reguladoras.....	37
3.11 Avaliação de morte celular no timo .....	38
3.12 Marcadores de lesão renal e hepática .....	38
3.13 Quantificação de hormônios tireoidianos .....	38
3.14 Determinação de leucócitos totais .....	39
3.15 Quantificação de plaquetas.....	39

3.16 Determinação de hematócrito .....	39
3.17 Contagem global de eritrócitos .....	40
3.18 Determinação de hemoglobina .....	40
3.19 Quantificação de citocinas e quimiocinas .....	41
3.20 Análise estatística .....	41
4. RESULTADOS .....	42
4.1 Tratamento com metimazol em ratos.....	43
4.2 Impacto do hipotireodismo na parasitemia .....	43
4.3 Consequência do hipotireoidismo na saúde dos órgãos durante a fase aguda da doença de Chagas .....	44
4.4 Avaliação de parâmetros hematológicos .....	46
4.5 Contagem diferencial para determinação de diferentes populações de leucócitos sanguíneos.....	48
4.6 Quantificação de quimiocinas plasmáticas .....	49
4.7 Determinação da celularidade do baço e timo.....	50
4.8 Maturação de linfócitos no timo .....	53
4.9 Determinação da frequência de linfócitos T no baço .....	54
4.10 Avaliação de marcadores de ativação de linfócitos T .....	56
4.11 Determinação da frequência de linfócitos B no baço.....	57
4.12 Avaliação da frequência e ativação de macrófagos no baço.....	58
4.13 Avaliação da frequência e ativação de células dendríticas no baço.....	59
4.14 Quantificação de citocinas plasmáticas .....	61
4.15 Frequência de células NK, NK T e T reguladoras no baço.....	63
5. DISCUSSÃO .....	65
6. CONCLUSÃO.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8. ANEXOS.....	99

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DNTs) consistem em um conjunto de patologias ocasionadas por agentes infecciosos, comumente encontrados em países em desenvolvimento, pelo qual uma parcela importante da população reside em locais de alta vulnerabilidade econômica e social. Desse modo, doenças como a leishmaniose visceral, a malária e a doença de Chagas por exemplo, possuem baixo interesse das indústrias farmacêuticas para a pesquisas de novos medicamentos e terapias, devido ao ínfimo retorno lucrativo, o que gera dependência de entidades filantrópicas e universidades para a promoção de novos avanços científicos (BODIMEADE; MARKS; MABEY, 2019; MOLYNEUX; SAVIOLI; ENGELS, 2017).

De grande importância entre as DNTs, a doença de Chagas é uma antroponose descoberta no continente americano, mas em função da globalização e migração, se propagou para as demais localidades, tais como a África e a Ásia (COURA; VIÑAS, 2010; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2017). Estima-se que aproximadamente 7 milhões de pessoas encontram-se acometidas por essa patologia ao redor do mundo e apenas na América Latina, 21 países possuem áreas endêmicas para a doença de Chagas (“Chagas disease (American trypanosomiasis)”, [s.d.]).

O protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, foi identificado em 1909 pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, que além de sua identificação, foi responsável por descrever o ciclo de vida do parasito, compreender as manifestações clínicas da doença e também o seu mecanismo de transmissão (CHAGAS, 1909; KROPF, 2011; PRATA, 1999). O *Trypanosoma cruzi* é um parasito intracelular obrigatório, pertencente a ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae. Suas características inatas, se baseiam na existência de um flagelo único e do cinetoplasto volumoso, organela que contém o DNA mitocondrial, sempre localizada próximo a região da base flagelar nos tripanosomatídeos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; SCHOFIELD, 2000).

De forma geral, diversos mamíferos além do homem, podem servir de reservatórios para a subsistência de *T. cruzi*, desde animais silvestres até os domiciliares, como roedores, primatas, felinos, marsupiais, suínos silvestres, morcegos e carnívoros. Assim, estima-se que mais de 100 espécies distintas já foram

identificadas como reservatórios do parasito (GÜRTLER; CARDINAL, 2015; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018).

A via clássica de transmissão em regiões endêmicas para doença de Chagas ocorre de forma vetorial, ou seja, pela excreção de fezes contaminadas durante a alimentação hematófaga de insetos vetores da subfamília Triatominae em hospedeiros vertebrados (MONTEIRO et al., 2018).

Durante o processo infeccioso, o parasito passa por distintas alterações morfológicas tanto no tubo digestivo do vetor invertebrado como também no hospedeiro residente. De forma geral, o inseto adquire as formas tripomastigotas através do processo de alimentação sanguínea em hospedeiro animal previamente infectado. Posteriormente, *T. cruzi* migra para o estômago do inseto, onde se transforma em epimastigotas. Logo após um intenso processo de reprodução por fissão binária o parasito assume a morfologia tripomastigota metacíclica. Essas formas migram para o intestino posterior do inseto e são liberadas pelas fezes e urina durante um novo processo de alimentação sanguínea.

A penetração no hospedeiro humano ocorre via mucosa ou solução de continuidade (pele lesada pela picada do inseto), o que facilita o acesso dos tripomastigotas metacíclicos à corrente sanguínea. Posteriormente ao processo de fagocitose por leucócitos residentes, os micro-organismos adquirem a morfologia amastigota no interior celular. As formas amastigotas efetuam sucessivas divisões binárias no citoplasma. Logo após esse processo, elas modificam-se em tripomastigotas e são capazes de romper a membrana celular, proporcionando assim a sua disseminação pela corrente sanguínea e linfa do hospedeiro vertebrado. O ciclo natural da doença de Chagas torna-se completo quando as formas tripomastigotas sanguíneas são novamente ingeridas por um Triatomíneo (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

É importante pontuar, que além da via de transmissão vetorial, a infecção por *T. cruzi* também pode ocorrer por vias secundárias, como por exemplo, através da transmissão congênita, transfusão de sangue, acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos, bem como pela infecção oral, através da ingestão de alimentos e água contaminados com o parasito (BENCHIMOL BARBOSA, 2006). O aumento da incidência de surtos de infecções por *T. cruzi* relacionados à contaminação alimentar em diversas regiões do Brasil, refere-se ao consumo de alimentos comuns da cultura popular, como caldo de cana, açaí e sucos de frutas.

Essa modalidade de transmissão oral tem alertado as autoridades em saúde para a implementação de medidas preventivas e sanitárias em regiões endêmicas para doença de Chagas no país (GHF et al., 2020; MONSALVE-LARA et al., 2021). Independente do mecanismo de transmissão, os indivíduos acometidos pela infecção chagásica, podem desenvolver fases distintas da doença.

A fase aguda da doença de Chagas geralmente se apresenta de forma assintomática e é caracterizada pela intensa replicação do protozoária na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Concomitantemente temos o início da montagem de resposta imunológica específica, o que predispõe o controle da infecção em aproximadamente 90% dos indivíduos acometidos. As manifestações sintomatológicas nessa fase se apresentam de forma moderada e inespecífica, com episódios de febre, cefaleia, exantema, inflamação local (em casos de infecção vetorial), náuseas, vômitos, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, o que dificulta o diagnóstico na fase inicial da doença pela ausência de manifestações específicas da doença de Chagas.

A duração da fase aguda ocorre entre 4-8 semanas do contato inicial com o parasito e apresenta manifestações graves (miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite) em menos de 1-5% dos pacientes infectados, e não induz maiores complicações para a maioria dos pacientes acometidos (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; PINTO et al., 2008). No entanto, quando a forma de contaminação ocorre por via oral, altas taxas de mortalidade já foram observadas (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017; NOYA et al., 2015).

A partir de 2 meses do início da infecção, por mecanismos ainda não totalmente elucidados, alguns pacientes podem desenvolver a fase indeterminada da doença de Chagas, que é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas associados à infecção, baixa ou nenhuma evidência de alterações cardíacas ou digestivas, porém, marcada pela soroconversão imune, com a presença de anticorpos IgG específicos e a migração de *T. cruzi* para os órgãos alvo da infecção (STANAWAY; ROTH, 2015).

A fase indeterminada da doença de Chagas pode prevalecer por décadas (10-30 anos) ou mesmo por toda a vida do paciente acometido, no entanto, aproximadamente 20-30% dos indivíduos infectados progridem para a fase posterior da patologia, que consiste em um período sintomático da doença, com o surgimento de alterações cardiovasculares e/ou digestivas e alta possibilidade de morbidade e mortalidade (ECHAVARRÍA et al., 2021).



## 1.2 Doença de Chagas e o sistema imune

Os mecanismos que conferem resistência ou suscetibilidade na doença de Chagas estão completamente interligados aos perfis de resposta imune gerados a partir do contato inicial entre o hospedeiro vertebrado e o parasito. Deste modo, a ativação de resposta imune protetora na fase aguda da doença, se torna imprescindível para o controle da replicação parasitária, como também para a prevenção de lesões teciduais associadas à inflamação na fase crônica da patologia (CARDILLO et al., 2015). Células imunes inatas e adquiridas, bem como componentes inflamatórios, contribuem para resistência do hospedeiro.

A princípio, células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês – *Antigen Presenting Cells*) como macrófagos e células dendríticas, foram descritas como a primeira linha de defesa contra o patógeno invasor, devido à alta expressão de receptores padrões de reconhecimento de patógenos (PRRs, do inglês - *Pattern Recognition Receptors*) nessas células, o que favorece o processo de identificação e fagocitose do micro-organismo. Durante os estágios iniciais, após a internalização de *T. cruzi*, fagócitos especializados realizam o processamento e a apresentação de antígenos na superfície celular via moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo II (CARDILLO et al., 2015; GIL-JARAMILLO et al., 2016; WATANABE COSTA; DA SILVEIRA; BAHIA, 2016).

Embora o processo de apresentação de antígenos por APCs seja condição indispensável para a estimulação de resposta imune adquirida, a ativação de linfócitos, depende também da interação entre moléculas co-estimulatórias expressas por macrófagos e células dendríticas. Dentre elas, a glicoproteína CD28 presente constitutivamente em linfócitos T, interage com as moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), expressas de forma indutiva em APCs (NAGAI; AZUMA, 2019). Já o terceiro sinal essencial para a ativação completa de linfócitos T, provém de citocinas produzidas por APCs ativadas (CHAPMAN; BOOTHBY; CHI, 2020).

O microambiente inflamatório gerado a partir do contato entre fagócitos e o parasito, promove a produção de interleucina-12 (IL-12), que juntamente com a apresentação antigênica e eficiente co-estimulação, levam em conjunto, a diferenciação de linfócitos T *naïves* para o padrão de resposta Th1, produtores de IFN- $\gamma$  (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996; GALVÃO DA SILVA; JACYSYN; DE

ALMEIDA ABRAHAMSOHN, 2003). Essa citocina, por sua vez, atua em macrófagos, ativando a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), com consequente produção de óxido nítrico (NO) e morte dos parasitos fagocitados (CAMARGO et al., 1997; MACHADO et al., 2008). Juntamente com o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  provindos de leucócitos ativados, também aumentam a expressão de iNOS (SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003). É importante pontuar, que não somente os linfócitos Th1, mas também, as células naturais killer (NK) e os linfócitos T CD8 são fontes importantes de IFN- $\gamma$  (CARDILLO et al., 1996; SILVERIO et al., 2012).

Além da produção de citocinas, células T CD8 também desempenham outras funções de caráter protetor na fase aguda da doença de Chagas. Uma importante especialidade dessas células, consiste na produção de grânulos, como perforinas e granzimas, que atuam na eliminação de células infectadas (por apoptose), conferindo resistência a infecção (SILVERIO et al., 2012). Consequentemente, evidências experimentais demonstram que a depleção ou a inibição de células T CD8 resultam em maior mortalidade de animais infectados, com exacerbada carga parasitária tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas (TARLETON, 1990; TARLETON et al., 1994).

Linfócitos B também possuem papel crucial para montagem de resposta imune eficiente contra o *Trypanosoma cruzi*. Uma maior gravidade da doença, foi observada em camundongos geneticamente deficientes de células B, quando comparados aos animais controles. Dentre os parâmetros encontrados, destaca-se o aumento de parasitemia, menor população de células T CD4 e T CD8 no baço, e baixa polarização de células Th1 nos estágios iniciais da infecção (CARDILLO et al., 2007). Outro indicador científico, sugeriu que a manutenção da funcionalidade e o desenvolvimento de linfócitos T CD8 de memória ao longo da infecção chagásica, dependem da atividade de células B (SULLIVAN et al., 2015). A ativação de células B CD11b<sup>+</sup> humanas, foi relacionada a um melhor prognóstico clínico e a prevenção de cardiomiopatia na doença de Chagas (PASSOS et al., 2018).

Em contrapartida, o avanço da pesquisa científica nas últimas décadas, possibilitou a caracterização de populações celulares e mediadores imunes correlatos ao perfil de suscetibilidade na infecção chagásica. O desenvolvimento de resposta imune mediada por linfócitos Th2 durante a fase aguda da doença de Chagas, com predominância de altos níveis de IL-4, e ausência de IL-12, promove a progressão da infecção, levando a desativação de respostas protetoras, como a polarização de

linfócitos Th1 e ativação de macrófagos, o que facilita a replicação e sobrevivência do parasito (HIYAMA et al., 2001; KUMAR; TARLETON, 2001).

Outra célula de perfil linfocitário extensivamente estudada na doença de Chagas são os linfócitos T reguladores. Essas células desempenham funções importantes na prevenção de lesões teciduais e na regulação de ativação imune exacerbada, seja pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , ou mesmo pela expressão de moléculas de atividade imunossupressora, como o CTLA-4, molécula com atividade inibitória de linfócitos efetores (LEHTIMÄKI; LAHESMAA, 2013). No entanto, tanto em modelos animais como em protocolos clínicos, o envolvimento de células T reguladoras na doença de Chagas parece ser controverso.

Pacientes que apresentam a forma clínica indeterminada da doença de Chagas possuem maior frequência de linfócitos T regs quando comparados aos indivíduos com manifestações cardíacas da patologia, o que sugere papel benéfico dessas células no prognóstico clínico (DE ARAÚJO et al., 2011). No entanto, a baixa frequência de células T regs na fase aguda da doença de Chagas em modelos animais, possibilita o acúmulo de células imunes efectoras e melhor eficácia no controle parasitário, porém, a ausência de regulação, intensifica o surgimento de lesões teciduais (ARAÚJO FURLAN et al., 2018). De forma divergente, outra pesquisa, sugeriu pouca implicação de linfócitos T regs na doença de Chagas, visto que a depleção de células CD25 positivas em camundongos infectados, para caracterização funcional de células T reguladoras, não modificou parâmetros imunes ou parasitológicos, como a parasitemia dos animais e a magnitude da função de linfócitos T CD8 (KOTNER; TARLETON, 2007).

Independente do perfil de linfócitos T gerados, o timo é o órgão linfoide primário responsável pela maturação e diferenciação final dessas células. Esse processo ocorre em diferentes etapas na zona marginal e cortical tímica a partir de progenitores linfoides provenientes da medula óssea. Inicialmente, células T imaturas passam pela recombinação somática e expressão do receptor de células T (TCR), seguido de proliferação celular. Subsequentemente, há o início da expressão dos co-receptores CD4 e CD8 na superfície celular, fase classicamente descrita como duplo-positivos. Agora, os timócitos migram em direção a medula tímica e entram em contato com antígenos próprios por apresentação antigênica. A interação com antígenos expressos via MHC I determina a diferenciação para células simples positivo de perfil

CD8, enquanto que a apresentação via MHC II pressupõe a diferenciação para simples positivo CD4. No entanto, somente células que se ligam com afinidade adequada ao complexo MHC/antígeno recebem estímulo para sobrevivência. Ao final do processo, células T maduras deixam o timo e migram para a periferia, a fim de exercerem suas funções (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010; THAPA; FARBER, 2019).

Disfunções tímicas importantes foram descritas durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Um desequilíbrio imunoendócrino foi observado em animais chagásicos no 17º dia pós infecção, devido ao aumento de resposta inflamatória, com alta produção de TNF- $\alpha$  e do hormônio corticosterona. Além disto, outros achados, como a atrofia grave do timo e a depleção de células tímicas imaturas (duplo-positivo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) foram relatados (PÉREZ et al., 2007). Pacientes com a forma cardíaca grave na doença de Chagas, apresentam aumento de células T duplo negativos na circulação periférica, o que atesta o desequilíbrio na maturação de linfócitos e funcionalidade tímica durante a infecção (LEPLETIER et al., 2014).

Células NK e NK T também participam da modulação imune na doença de Chagas. Em estudos experimentais, a depleção de células NK nas fases iniciais da doença, promoveu aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 e prejudicou os níveis de IFN- $\gamma$ , impedindo o controle da replicação parasitária (CARDILLO et al., 1996). Ainda nesse contexto, outra pesquisa utilizando camundongos de linhagem C57BL/6, fortaleceu a importância de células NK para o controle de parasitos sanguíneos na fase aguda da doença de Chagas (LIEKE et al., 2004). Embora existam poucos trabalhos sobre o papel de células NK T na infecção por *T. cruzi*, Duthie et al. (2002) descreveram que células NK T auxiliam na produção de IFN- $\gamma$  na fase aguda da doença de Chagas e facilitam o controle de carga parasitária. Além disso, animais deficientes de células NK T apresentam piora na geração de resposta imune humoral na fase crônica do doença de Chagas (DUTHIE et al., 2002).

Componentes inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, desempenham ação fundamental na resistência ou suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*. Além do IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (citocinas que conferem resistência e amplamente citadas acima), outros mediadores foram associados a ativação celular, controle infeccioso ou mesmo a um melhor prognóstico da doença de Chagas.

A interleucina-17 possui papéis clássicos na migração e ativação de leucócitos, no controle de infecções, e na patogênese de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, por exemplo (LING; PUEL, 2014; MCGEACHY; CUA; GAFFEN, 2019).

No que se refere a doença de Chagas, a IL-17 exerce uma série de ações benéficas. Dados clínicos, sugerem que pacientes chagásicos com alto comprometimento cardíaco dispõem de reduzida frequência de células T CD4 produtoras de IL-17 (GUEDES et al., 2012). Em acréscimo, Magalhães et al. (2013) demonstraram que a alta expressão de IL-17 em células imunes, possui relação com uma melhor condição clínica, ao comparar indivíduos que apresentam a forma indeterminada e os que desenvolvem a manifestação clínica cardíaca da doença (MAGALHÃES et al., 2013). O estudo sobre a IL-17 em animais proporcionou descobertas importantes. Camundongos deficientes em IL-17A e infectados com *T. cruzi*, apresentam uma série de complicações graves, associados à lesão hepática (determinado pela quantificação de AST), geração de resposta inflamatória reduzida (baixos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), e elevada carga parasitária na fase aguda da patologia, o que favoreceu o aumento da taxa de mortalidade nesses animais (MIYAZAKI et al., 2010).

O envolvimento de quimiocinas envolvidas na migração de leucócitos já foi investigado na doença de Chagas. Por mecanismos não totalmente conhecidos, o bloqueio mútuo dos receptores de CCL5 e MIP-1 $\alpha$  em ratos infectados, promoveu aumento de inflamação e fibrose no coração dos animais, sugerindo papel protetor desses mediadores na fase aguda da doença de Chagas (ROFFÊ et al., 2010, p. 3). Ao avaliar a expressão possíveis de biomarcadores relacionados a gravidade da doença cardíaca na doença de Chagas, reduções nos níveis da quimiocina MCP-1 foram associados a um pior prognóstico clínico (KEATING et al., 2015).

Por outro lado, algumas citocinas e mediadores inflamatórios parecem ter funções incertas ou favoráveis a suscetibilidade ao longo da infecção chagásica. A interleucina-10 possui múltiplas atividades conhecidas na imunoregulação e inflamação (OUYANG et al., 2011). Em estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*, a ativação específica de linfócitos T CD4 produtores de IL-10 e IL-4, promove aumento de parasitemia e mortalidade de animais infectados, com redução na geração de resposta Th1, e diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  (BARBOSA DE OLIVEIRA et al., 1996). Conseqüentemente, a produção endógena de IL-10, foi associada à suscetibilidade na fase aguda da doença de Chagas (REED et al., 1994).

A interleucina-18 é um fator indutor de IFN- $\gamma$  na doença de Chagas, o que sugere papel benéfico dessa interleucina na fase aguda desta doença (MÜLLER et al., 2001). No entanto, essa citocina parece ter funções distintas entre as infecções por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da patologia.

Camundongos deficientes de IL-18 e infectados com a cepa Colombiana apresentaram menor infiltrado inflamatório no tecido cardíaco e reduzida carga parasitária na fase crônica da patologia, o que sugere influência da IL-18 na patogênese da doença de Chagas. Porém, não houve interferência da IL-18 em parâmetros imunes e parasitológicos avaliados entre animais controles e nocautes para IL-18, quando infectados com a cepa Y de *T. cruzi* (ESPER et al., 2014).

A interleucina-6 também parece ter papel prejudicial na doença de Chagas. Sanmarco et al. (2017) demonstraram que a IL-6 regula negativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos em resposta à infecção por *Trypanosoma cruzi*, prejudicando o controle parasitário (SANMARCO et al., 2017). Dados clínicos, encontraram um pior prognóstico associado a insuficiência cardíaca na doença de Chagas, correlacionados a altos níveis de IL-6 em amostras sanguíneas de pacientes (LÓPEZ et al., 2006).

### **1.3 Hormônios da tireoide e o hipotireoidismo**

As inter-relações entre os sistemas biológicos do corpo humano atuam de forma imprescindível para o bom funcionamento do mesmo, uma vez que mediadores gerados por diferentes órgãos e tecidos podem ganhar a circulação sanguínea e desempenhar funções regulatórias em diversas localidades (JOHNSTONE et al., 2014). De grande importância para os avanços científicos na área de fisiologia endócrina, os estudos sobre a glândula tireoide contribuem de forma ímpar para o melhor entendimento do metabolismo celular e tecidual (FLINK, 1981; KHAN; FARHANA, 2022).

A glândula tireoide consiste em um tecido conservado ao longo do processo evolutivo e encontra-se localizada na região ântero-lateral do pescoço, abaixo da proeminência laríngea (popularmente conhecida como Pomo-de-Adão) e consiste em dois lobos adjacentes ligados entre si por um istmo mediano de tamanho variável, apoiados em torno dos anéis iniciais da tranqueia e das cartilagens cricoides na base inferior da laringe, apresentando aproximadamente 15 a 25g em indivíduo adulto (MOHEBATI; SHAHA, 2012).

Sua composição celular é constituída por folículos tireoidianos revestidos por células epiteliais cuboides, estruturas abundantes em células foliculares, cuja a principal função consiste na secreção da substância coloide para o interior do folículo,

substância rica em tireoglobulinas, glicoproteínas precursoras da síntese dos hormônios iodados. Entre as células foliculares esféricas, também podem ser encontradas células parafoliculares dispersas, especializadas em produzir o hormônio calcitonina, importante regulador da reabsorção de cálcio ósseo (INZERILLO; ZAIDI; HUANG, 2002; PIRAHANCHI; TARIQ; JIALAL, 2021).

Em condições fisiológicas, a atividade da glândula tireoide ocorre pela ativação do eixo hipotálamo-hipofisário. Basicamente, os hormônios iodados, triiodotironina (T3) e tetraiodotiorina ou tiroxina (T4), são sintetizados por iodação de resíduos de tirosina na glicoproteína tireoglobulina. Esse processo dependente especificamente da ação do hormônio estimulante da tireoide (TSH), produzido pela hipófise, que atua nos receptores (TSH-r) expressos nos folículos tireoidianos. Já a produção de TSH ocorre sob a influência do hormônio estimulante da tirotrofina (TRH) sintetizado pelo hipotálamo. Altas concentrações de T3 e T4 na corrente sanguínea podem regular negativamente a liberação de TSH pela hipófise (CHIAMOLERA; WONDISFORD, 2009; ORTIGA-CARVALHO et al., 2016; PIRAHANCHI; TARIQ; JIALAL, 2021).

Embora a glândula tireoide secrete mais predominantemente o hormônio T4, aproximadamente 80% dessa produção será convertida em T3 por enzimas de desiodação nos tecidos periféricos, fato importante, visto que T3 apresenta maior afinidade pelos receptores nucleares TR $\alpha$  e TR $\beta$ , altamente expressos na maioria dos tecidos e órgãos. Após a ativação dos receptores TRs, fatores de transcrição são ativados, proporcionando a regulação da expressão gênica e a expressão de proteínas específicas relacionadas ao metabolismo, crescimento e desenvolvimento celular (BRENT, 2012). No entanto, as ações via interação hormônio-receptor não são o único mecanismo de ação conhecido dos hormônios iodados. Entre as ações não genômicas, destaca-se a possibilidade de interação direta de HTs com organelas (mitocôndrias e retículo endoplasmático), transportadores e canais iônicos de membrana, tal como na ativação direta de quinases específicas, como a MAPK (proteína ativadora por mitógeno) por exemplo (DAVIS; GOGLIA; LEONARD, 2016; LIN et al., 2012; MYLOTTE et al., 1985).

O estudo funcional dos hormônios tireoidianos possibilitou a compreensão do papel central e periférico de T3 e T4, visto que alterações e desordens no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide promovem um significativo impacto no metabolismo celular e energético. Dentre as principais disfunções tireoidianas conhecidas, destaca-se o hipotireoidismo, que consiste em uma condição clínica associada à baixa função

tireoidiana, determinada por quantificações insuficientes de T4 livre e elevada produção de TSH (PATIL; REHMAN; JIALAL, 2022).

De forma geral, as apresentações clínicas e implicações mais comuns do hipotireoidismo estão relacionadas à fadiga, letargia, ganho de peso, constipação, alterações de voz, intolerância ao frio, pele seca, hipercolesterolemia, distúrbios hemodinâmicos e cardiovasculares, dentre outros, contudo, devido à grande variação na apresentação clínica entre pacientes distintos (sexo, idade e tempo de surgimento da doença) tal como pela escassez de sintomas específicos da doença, a identificação do hipotireoidismo é feita de forma predominantemente laboratorial (CHAKER et al., 2017).

Embora a identificação do hipotireoidismo ocorra de forma assertiva na maioria dos casos, a ausência de diagnóstico e a falta de reposição hormonal por longos períodos, promove alterações graves, como hipotensão, confusão mental, bradicardia, hipotermia extrema e possível progressão para a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e morte (BEYNON; AKHTAR; KEARNEY, 2008; RIZZO et al., 2017).

No âmbito clínico, o hipotireoidismo pode ser classificado conforme a localização da lesão tecidual no eixo hipófise-hipotálamo-tireoide, desse modo, classifica-se em primário (doença específica na glândula tireoide), secundário (na hipófise) e terciário (no hipotálamo), sendo o hipotireoidismo primário o de maior incidência global e também o foco de nosso estudo (ALMANDOZ; GHARIB, 2012).

A hipofunção tireoidiana pode ocorrer por diversas causas e consequências. A ingestão de iodo na concentração ideal é um fator indispensável para a síntese de T3 e T4, e consequente prevenção do hipotireoidismo, contudo, milhares de habitantes residem em regiões cuja a utilização desse mineral ocorre de forma insatisfatória, como em regiões da África, Sudeste da Ásia e América Central e do Sul. Embora os programas globais de combate a deficiência de iodo tenham feito grandes avanços na última década, 21 países ainda realizam a suplementação de iodo de forma insuficiente, o que potencializa o risco de desordens tireoidianas. Desse modo, o baixo consumo de iodo ainda é a principal causa de hipotireoidismo em escala global (VANDERPUMP, 2011; ZIMMERMANN; ANDERSSON, 2021).

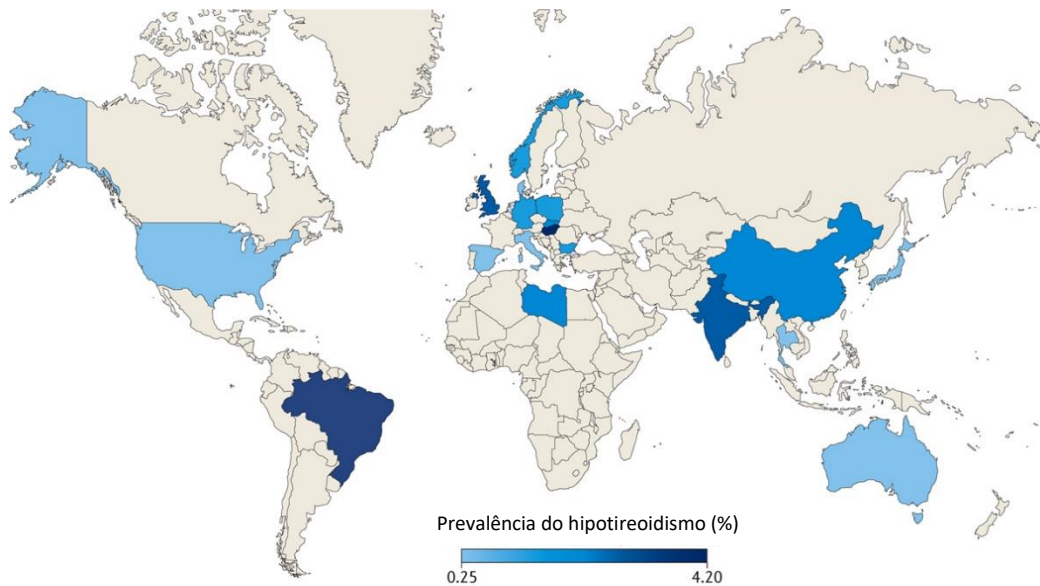
No entanto, outras condições também podem ser determinantes para o surgimento do hipotireoidismo, como o uso de medicamentos, doenças autoimunes, emergência de neoplasias, predisposição genética, terapias radioativas e cirurgias na



glândula tireoide (TAYLOR et al., 2018). Em regiões iodo-suficientes, as doenças de caráter autoimune são a principal etiologia do hipotireoidismo. Um exemplo importante, é a Tireoidite de Hashimoto, uma patologia imunomediada identificada em 1912 pelo médico japonês Hakaru Hashimoto, que tem como principal característica o alargamento progressivo da glândula tireoide e perda de função tecidual. Essa alteração se deve ao intenso processo inflamatório, com infiltrado linfocitário difuso, presença de autoanticorpos (anti-tireoglobulina e anti-tireoperoxidase) e subsequente destruição dos folículos tireoidianos, promovendo o desenvolvimento gradual do hipotireoidismo (HIROMATSU; SATOH; AMINO, 2013).

Baseado em dados epidemiológicos globais, estima-se que a prevalência do hipotireoidismo na população em geral ocorra entre 0,25% a 4,20% (TAYLOR et al., 2018), porém, em algumas regiões as taxas de hipotireoidismo podem ser ainda maiores (UNNIKISHNAN et al., 2013). Em estudo avaliando a prevalência de casos de Tireoidite de Hashimoto na região metropolitana de São Paulo, 6,6% dos participantes adultos foram diagnosticados com hipotireoidismo, o que sugere alta prevalência dessa patologia no Brasil (CAMARGO et al., 2006). Em concordância, Pontes e Colaboradores 2002, ao avaliarem a prevalência de doenças tireoidianas em uma região do nordeste do Brasil, observaram que 4,5% dos voluntários adultos e sem queixas associadas à tireoide, apresentavam exames bioquímicos confirmatórios do quadro de hipotireoidismo (PONTES et al., 2002).

**Figura 1.** Prevalência global do hipotireoidismo.



Fonte: (Adaptado de Taylor et al., 2018)

Por mecanismos ainda não totalmente conhecidos, sabe-se alguns grupos populacionais, como os de sexo feminino, indivíduos acima de 65 anos, gestantes e caucasianos, são mais propensos ao desenvolvimento do hipotireoidismo (PATIL; REHMAN; JIALAL, 2022; SICHIERI et al., 2007; SULLIVAN, 2019; TAYLOR et al., 2018). Assim, evidências científicas suportam a hipótese de que mulheres apresentam aproximadamente 10 vezes maior possibilidade de desenvolverem o hipotireoidismo quando comparado aos indivíduos do sexo masculino e que essa probabilidade aumenta com o envelhecimento (VANDERPUMP, 2011). Em estudo realizado em 2007, testificou-se que mulheres caucasianas são mais suscetíveis a hipofunção tireoidiana do que as de etnia negra ou parda (SICHIERI et al., 2007).

A compreensão sobre o impacto do hipotireoidismo em modelos infecciosos, apontam um papel prejudicial da hipofunção tireoidiana, associada à suscetibilidade em infecções virais (VAREDI et al., 2014), porém, até o momento, as implicações dessa patologia em doenças desencadeadas por protozoários permanecem desconhecidas.

#### **1.4 Consequências dos hormônios tireoidianos no sistema imune**

De forma geral, os hormônios tireoidianos atuam em basicamente todos os tecidos e órgãos, uma vez que quaisquer células nucleadas expressam receptores específicos para triiodotironina e tiroxina (MULLUR; LIU; BRENT, 2014). Assim, evidências científicas sugerem uma intrínseca comunicação e regulação bidirecional entre o sistema endócrino e a modulação imune (FRANÇA; LOTTI, 2017; JARA et al., 2017). Ao longo das últimas décadas, a compreensão do papel de HTs e o estudo sobre as desordens tireoidianas (hipotireoidismo e hipertireoidismo) em modelos clínicos e pré-clínicos, permitiu novas descobertas sobre o sistema neuroimunoendócrino (RUBINGH et al., 2020).

Descrito como a primeira linha de proteção contra patógenos invasores, o sistema imune inato consiste em um conjunto de células, proteínas e componentes físicos e químicos, que atuam rapidamente após o contato inicial com os micro-organismos patogênicos. Células efectoras como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células natural killer compõe uma parte fundamental da resposta imune inata (MCCOMB et al., 2019), e está bem estabelecido que os mediadores tireoidianos modulam diretamente a atividade dessas células (RUBINGH et al., 2020).

Os neutrófilos desempenham papéis essenciais no combate às infecções bacterianas, fúngicas e auxiliam também no controle de doenças parasitárias (AITKEN; ALEMU; ROGERSON, 2018; PARKER et al., 2021). Marino et al. (2006) demonstraram que polifomorfonucleares provenientes de pacientes hipotireoideos produzem quantidades inferiores de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando estimulados em cultura e comparados a neutrófilos de indivíduos saudáveis (MARINO et al., 2006). Por outro lado, o hipertireoidismo promove aumento na geração de ROS em neutrófilos e macrófagos (MAGSINO et al., 2000; SZABÓ et al., 1996). Funções efectoras de neutrófilos, como a produção de mieloperoxidase (MPO) e a capacidade oxidativa, são positivamente reguladas sob estímulo de T3 (FERNÁNDEZ; VIDELA, 1995).

Fundamentais para a ativação de resposta imune adquirida, células dendríticas e macrófagos ativados, expressam moléculas de co-estimulação e produzem citocinas, fatores indispensáveis para a diferenciação e expansão clonal de linfócitos (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). Dedecjus et al. (2011) descreveram que a terapia com L-tiroxina em pacientes tireoidectomizados, promove maior diferenciação de

células dendríticas. Em concordância, a expressão da molécula com atividade co-estimuladora em DCs, CD86, foi positivamente regulada sob estímulo de T3 *in vitro* (DEDECJUS et al., 2011).

No que se refere a produção de citocinas, a exposição de células dendríticas murinas ao triiodotironina, favoreceu a geração de mediadores, como IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IL-23. Do mesmo modo, esplenócitos estimulados com T3, produzem elevadas quantidades de IFN- $\gamma$  e IL-17 (ALAMINO et al., 2019). A citocina IL-18 possui ação central na ativação de células NK e linfócitos T (KAPLANSKI, 2018). Evidências científicas demonstram que macrófagos de pacientes hipertireoideos produzem quantidades elevadas desse mediador, enquanto que indivíduos acometidos pelo hipotireoidismo, apresentam níveis reduzidos de IL-18 (BOTELLA-CARRETERO et al., 2005; MAGSINO et al., 2000).

A maioria das células inatas expressam receptores eficientes em reconhecer estruturas moleculares conservadas em patógenos, o que favorece o processo de fagocitose de micro-organismos (MCCOMB et al., 2019). Parâmetros imunológicos foram avaliados em ratos senescentes após 30 dias consecutivos de administração de T4. Além do aumento do número de células do timo, baço, linfonodo mesentérico e medula óssea, houve maior atividade fagocítica em macrófagos após o desafio de T4 (EL-SHAikh; GABRY; OTHMAN, 2006). Por outro lado, em ensaios experimentais pré-clínicos, observou-se que macrófagos provenientes de animais hipotireoideos apresentam melhor capacidade de fagocitose do que macrófagos de animais saudáveis (ROSA; SAFI; CURI, 1995), fato esse, que sugere ação controversa dos hormônios tireoidianos na capacidade de fagocitose por células imunes.

Outra importante correlação entre os hormônios tireoidianos e atividade de células inatas foi observado em células NK. Camundongos senescentes, independente do sexo, quando desafiados com L-T4, apresentam aumento no número de células natural killer (MAHONEY; CURRIER; MILLER, 1998). Em outro estudo, o papel de T4 em células NK de camundongos em diferentes idades foi avaliado. Observou-se que o tratamento com L-T4 promove aumento dessas células em animais com aproximadamente 3 semanas de idade, mas não em camundongos com idade superior ou inferior (PROVINCIALI et al., 1991; PROVINCIALI; DI STEFANO; FABRIS, 1994). Em adição, a hipertiroxemia em camundongos, reduz a capacidade citotóxica de células NK (STEIN-STREILEIN et al., 1987), indicando influência de HTs também na funcionalidade dessas células.

Além dos componentes de resposta imune inata, mediadores gerados pela glândula tireoide, podem ainda atuar em células imunes específicas, como os linfócitos T e B (RUBINGH et al., 2020).

Células B atuam em diversas frentes do sistema imunológico, como na produção de anticorpos específicos, apresentação de antígenos, geração de citocinas ou mesmo na regulação imune (LEÓN; BALLESTEROS-TATO; LUND, 2014; MAURI; BOSMA, 2012). Os linfócitos T possuem papéis clássicos na eliminação de células infectadas ou tumorais e na produção de citocinas, fator que favorece a modulação de todo o sistema imune, através da diferenciação, ativação e migração de células para os sítios de infecção (DONG, 2021; MCCOMB et al., 2019).

Em evidências clínicas e em ensaios utilizando modelos animais, o papel dos mediadores tireoidianos na proliferação, diferenciação e função de células da imunidade adaptativa está fundamentado. Redução dos níveis de T3 e T4 ocasionados por estresse crônico em camundongos, promoveram menor proliferação de células B e T, no entanto, essa alteração foi reestabelecida após o tratamento com tiroxina (FRICK et al., 2009). Em condições de hipertireoidismo em ratos, o aumento de HTs proporcionou uma maior disponibilidade de linfócitos T na circulação sanguínea, o que afetou significativamente o número de células T no timo dos animais (ROBINSON et al., 2014), demonstrando forte correlação entre a maturação de linfócitos e a ação dos hormônios tireoidianos.

Uma característica própria de linfócitos B ativados é a habilidade de mudança de isótipo, que consiste na geração de imunoglobulinas de maior competência na resolução de processos diversos, como na eliminação de infecções ou na ativação de leucócitos (ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016). Pacientes hipertireoideos dispõem de altos níveis séricos de imunoglobulinas M e G (IgM e IgG, respectivamente), comparado a indivíduos saudáveis (NANDAKUMAR et al., 2008). Outra pesquisa, encontrou alta produção de imunoglobulina A (IgA) por indivíduos hipertireoideos, apontando impacto de HTs na função de linfócitos B, contudo, a produção de imunoglobulina E (IgE) ainda é controversa nas disfunções tireoidianas, uma vez que tanto pacientes hipo quanto os hipertireoideos produzem altas quantidades de IgE quando comparados aos indivíduos normotireoideos (JAFARZADEH et al., 2010).

### 1.5 Indução do hipotireoidismo em modelo animal por metimazol

O estudo do hipotireoidismo em modelos animais possibilitou grandes descobertas sobre as consequências da hipofunção tireoidiana em processos celulares, metabólicos e infecciosos (MISHRA et al., 2021; PEIXOTO et al., 2021; VAREDI et al., 2014). Dentre as estratégias reconhecidas pela sociedade científica para a indução do hipotireoidismo em modelos animais, destaca-se o uso dos medicamentos antitireoidianos, devido ao baixo custo econômico, fácil manuseio e administração, bem como ao caráter pouco invasivo, quando comparado aos processos cirúrgicos e radioterápicos (COBOS-PUC et al., 2020; KENT; ATLURI; CUFFE, 2022).

Pertencente a classe dos fármacos derivados das tioamidas, o metimazol (MMI, do inglês – *Methimazole*) é uma das drogas de escolha para pacientes hipertireoideos, cujo o principal mecanismo de ação se baseia na inibição da produção de HTs pela glândula tireoide, através do bloqueio da enzima tireoperoxidase, proteína essencial para a etapa de iodação dos resíduos de tirosina na tireoglobulina. Como consequência do uso terapêutico do fármaco, há o comprometimento da síntese de novas moléculas de tiroxina e triiodotironina enquanto se é realizado o tratamento farmacológico (SINGH; CORREA, 2022).

Os efeitos colaterais do metimazol estão majoritariamente relacionados à dose do medicamento, sendo os mais comuns, o surgimento de urticárias e coceiras, e entre os efeitos raros, encontram-se a possibilidade de agranulocitose, hepatotoxicidade, teratogenicidade e o hipotireoidismo. Porém, a maioria dos efeitos, desaparecem após a descontinuação do medicamento (ROSS et al., 2016; SINGH; CORREA, 2022).

Nos últimos anos, levando em consideração a ação antitireoidiana do metimazol, o seu uso se tornou frequente em escala global, para a geração do hipotireoidismo em modelos animais. Importantes descobertas sobre o hipotireoidismo gestacional (KENT; ATLURI; CUFFE, 2022), o impacto dos HTs no sistema cardiovascular (SARATI et al., 2012), ou mesmo na compreensão das desordens tireoidianas no controle ou suscetibilidade à infecções (VAREDI et al., 2014), foram possíveis devido ao protocolo de hipotireoidismo via metimazol.

Em 2015, um grupo de pesquisadores do Departamento de Endocrinologia da Universidade de Shandong, na China, investigaram o efeito de diferentes doses e vias

de administração de metimazol em ratos *Wistar* para a indução do quadro de hipotireoidismo. De maneira interessante, o desafio com metimazol por 21 dias em sonda gástrica ou pela adição do medicamento em água de beber dos animais, promoveu efeitos similares no que se refere a quantificação de parâmetros tireoidianos associados a hipofunção, além disso, as doses de 0,02% ou 0,04% do medicamento diluídos em água de beber, também apresentaram a mesma eficácia para a instalação do hipotireoidismo (ZHOU et al., 2015b). Baseado nesses achados, nós e outros autores (SAMPAIO et al., 2020; SARATI et al., 2012; VAREDI et al., 2014), temos optado pelo uso de menor dose do medicamento e pela via de administração menos invasiva.

***OBJETIVOS***



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar as consequências do hipotireoidismo na fase aguda da doença de Chagas experimental.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a consequência do hipotireoidismo na magnitude da carga parasitária em animais infectados com *Trypanosoma cruzi*;

Determinar a influência da hipofunção tireoidiana na frequência e ativação de células imunes inatas, como macrófagos, células NK e células dendríticas;

Determinar o impacto do hipotireoidismo na frequência, ativação e maturação de linfócitos na infecção aguda da doença de Chagas;

Investigar o impacto do hipotireoidismo, da doença de Chagas e da associação das patologias, em parâmetros hematológicos e bioquímicos;

Avaliar a influência do hipotireoidismo, da doença de Chagas e das patologias em coletividade, na modulação de citocinas e quimiocinas plasmáticas.

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos machos de linhagem *Wistar Hannover*, com aproximadamente 5 semanas de idade e peso compreendido entre 120 e 140 gramas, provenientes do Biotério geral do Campus de Ribeirão Preto/USP. Os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura adequada (22 a 25°) no biotério do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e receberam água e ração *ad libitum* durante os dias de experimentação. O uso de animais e o modelo experimental foram conduzidos sob a aprovação do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Processo de número 19.1.149.60.8.

#### **3.2 Tratamento com metimazol para indução do hipotireoidismo**

Para indução do quadro de hipotireoidismo, os ratos receberam 0,02% de metimazol (MMI) diluídos em água de beber por 21 dias (ÖZGÜR et al., 2016; ZHOU et al., 2015b). O MMI foi obtido da BioLab (BioLab Sanus Pharmaceuticals, São Paulo, Brasil). No 21º dia, após a finalização do tratamento, uma alíquota de sangue foi coletada da cauda dos animais para determinação sérica de triiodotironina total (T3 total), tiroxina total (T4 total) e tiroxina livre (T4 livre) pela técnica de imunoenensaio quimioluminescente com auxílio do analisador Immulite 1000.

#### **3.3 Parasitos, infecção experimental e eutanásia**

Os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi* presentes em sangue total após a confirmação do quadro de hipotireoidismo. A cepa Y é mantida por passagens seriadas semanais em camundongos BALB/c no Laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP. Os ensaios de interesse foram realizados no 11º dia pós infecção, ponto esse, que se refere a fase aguda da doença de Chagas em modelo experimental. Os animais foram anestesiados por meio de uma dose intraperitoneal de 2,5% de

tribromoetanol a 0,1ml/10g do peso corporal, seguido do processo de eutanásia por decapitação.

### 3.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram determinados de forma randomizada, integrando 5 animais por grupo, sendo divididos em:

**Tabela 1.** Grupos experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Características</b>
Controle (nº 5)	Saudáveis, não hipotireoideos e não infectados
Infectado (nº 5)	Infectados e normotireoideos
Hipo (nº 5)	Hipotireoideos e não infectados
Hipo infectado (nº 5)	Hipotireoideos e infectados

### 3.5 Quantificação de parasitos

A determinação de parasitos sanguíneos foi realizada no 7º e 9º dia pós infecção, seguindo as orientações do método de Brener (BRENER, 1962). Para isso, uma alíquota de sangue fresco (5µl) foi coletada da cauda dos animais e adicionada a lâmina, cobrindo-a com lamínula de 22x22 mm. Em seguida, 50 campos microscópicos foram contados, com auxílio de microscopia óptica (Objetiva no aumento de 40 vezes). O número encontrado foi multiplicado pelo fator do microscópio, calculado para cada objetiva, levando em consideração o número de campos microscópicos existentes na área da lamínula.

### 3.6 Peso relativo dos órgãos e ganho de peso semanal

O peso dos animais foi monitorado semanalmente para investigação de perda ou ganho de massa corporal durante o protocolo experimental. No 11º dia de infecção, após a eutanásia, o baço, timo, fígado e coração foram coletados e pesados para determinação de peso relativo dos órgãos ( $[\text{órgão/peso do animal}] \times 100$ )

(CALABRESE et al., 2000). Os dados foram expressos em porcentagem, conforme demonstrado na figura 4.

### **3.7 Contagem diferencial**

Após a eutanásia dos animais e coleta de sangue total, a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos foi realizada pela técnica de esfregaço sanguíneo, baseado no método de coloração Panótico Rápido, seguindo as recomendações do fabricante (Kit adquirido no laboratório Laboclin, Ltd, Pinhais, Paraná, Brasil). Após a coloração, a determinação de monócitos, neutrófilos e linfócitos circulantes, foi realizada com auxílio de microscopia óptica (Objetiva no aumento de 100 vezes) e contador manual. A contagem de células foi realizada percorrendo a lâmina de uma borda a outra, até que se determine 100 células.

### **3.8 Preparação de tecidos e quantificação de células do baço e timo**

Brevemente, para determinação do número de células totais, após eutanásia dos animais no 11º dia pós infecção, os baços e timos foram removidos cirurgicamente. Os órgãos foram pesados e um fragmento de cada tecido foi macerado em 5 mls de PBS com auxílio de filtros de células do tipo cell strainer (poro de 100 µm), seguido de centrifugação (10 minutos, 1300 rpm, 4°C). As hemácias presentes em amostras do fragmento do baço foram lisadas por choque osmótico, através da utilização do meio ACK, e imediatamente após, os leucócitos presentes foram ressuspensos em meio RPMI completo. O número absoluto de células foi determinado pela contagem em Tripán Blue, na proporção de 1:100 em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico (aumento de 40 vezes) e contador manual.

### **3.9 Fenotipagem de células por citometria de fluxo**

Para fenotipagem de células do baço e timo de animais controles, hipotireoideos, infectados e hipo infectados, os leucócitos isolados foram ressuspensos em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/100µl. Logo após, as células foram incubadas com 50µl de Fcblock (BD PharMingen™) por 30 minutos a 4°C, com

objetivo de bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos aos receptores Fc na superfície celular. Subsequentemente, os anticorpos monoclonais para antígenos de superfície celular foram adicionados, conforme apresentados na tabela 2 e 3 (Exceto para determinação de células T reguladoras). Todos os anticorpos utilizados foram obtidos da BD PharMingen™. Após o período de incubação (30 min, 4°C na ausência de luz), as células foram novamente lavadas com PBS e ressuspensas em 100µl de PBS-formol 1%, seguido da aquisição das células por citômetro de fluxo (Citômetro BD LSRFortessa). As análises foram feitas usando o programa *FlowJo* (FlowCytometry Analysis Software v7.2.5) o qual permite analisar todas as células adquiridas (100.000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”), estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL).

**Tabela 2.** Anticorpos utilizados para fenotipagem de células do baço.

<b>Anticorpos</b>	<b>Fluorocromos</b>
Anti-CD3	APC
Anti-CD4	PE-Cy7
Anti-CD8	PE
Anti-ED-2 like	PE
Anti-CD11b/C	APC
Anti-CD11a	FITC
Anti-CD28	PE
Anti-RT1b	PerCP
Anti-CD80	PE
Anti-CD86	FITC
Anti-CD45RA	PE
Anti-CD161	FITC
Anti-Foxp3	Alexa fluor 647

**Tabela 3.** Anticorpos utilizados para fenotipagem de células do timo.

Anticorpos	Fluorocromos
Anti-CD3	APC
Anti-CD4	PE-Cy7
Anti-CD8	PerCP

### 3.10 Caracterização de células T reguladoras no baço

Após o processamento do baço e obtenção de células,  $2 \times 10^6$  células esplênicas foram adicionados aos tubos de citometria, com volume final de 100µl por tubo. Logo após, as células foram incubadas com 50µl de Fcblock (BD PharMingen™) diluído em tampão FACS (PBS, 2% de SBF e 0,1% de azida) por 30 minutos a 4°C, com objetivo de bloquear as ligações inespecíficas dos anticorpos aos receptores Fc na superfície celular. Após a lavagem das células com PBS (1x) e descarte do sobrenadante, os anticorpos monoclonais para detecção de proteínas de superfície foram adicionados, sendo eles, anti-CD3 FITC e anti-CD4 PE-Cy7. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos, a 4°C e em ausência de luz.

Após o procedimento de permeabilização de membrana celular, seguindo as recomendações do fabricante (Kit Bioscience, San Diego, EUA), foi realizada a marcação intracelular, para detecção do fator de transcrição Foxp3 (diluído 1/50, em solução de *Perm Wash-eBioscience*, San Diego, EUA), com auxílio de anticorpo Alexa Fluor 647, seguido de incubação por 30 min, a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão *staining buffer*, e ressuspendidas em 300µl do mesmo tampão. A aquisição das células foi realizada em citômetro de fluxo (Citômetro BD LSRFortessa). As análises foram feitas usando o programa *FlowJo* (FlowCytometry Analysis Software v7.2.5) o qual permite analisar todas as células adquiridas (100.000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas ("Gates"), estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL).

### **3.11 Avaliação de morte celular no timo**

Após a coleta do timo no 11<sup>o</sup> dia pós infecção, o número de células do órgão foi determinado e a concentração de  $2 \times 10^6$  células por poço foi ajustada em tubos de citometria (volume final de 100µl em meio RPMI). 1µl de iodeto de propídeo (PI) foi adicionado a cada amostra, seguido da leitura em citômetro de fluxo (Citômetro BD LSRFortessa). As análises foram feitas usando o programa *FlowJo* (FlowCytometry Analysis Software v7.2.5) o qual permite analisar todas as células adquiridas (100.000/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”), estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL).

### **3.12 Marcadores de lesão renal e hepática**

Foram utilizados kits comerciais da Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais) para dosagem de parâmetros hepáticos, como aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), e para avaliação de função renal, a determinação de creatinina K. As amostras de sangue coletadas com auxílio de heparina, foram centrifugadas (9.000 x g por 5 minutos) para separação do plasma. Em seguida, os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante, com posterior leitura em espectrofotômetro. Os resultados de AST e ALT foram expressos em U/L, enquanto os valores de creatinina K foram apresentados em ng/dL.

### **3.13 Quantificação de hormônios tireoidianos**

Após o 21<sup>o</sup> dia de tratamento com metimazol, uma alíquota de sangue da cauda dos animais tratados e não tratados foi coletada, seguido de separação do soro por centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos. As quantificações de tiroxina total (T4), tiroxina livre (T4L) e triiodotironina total (T3) foram realizadas para confirmação do quadro de hipotireoidismo. O método utilizado foi a técnica de imunoenensaio quimioluminescente competitivo de fase sólida com enzima marcada, seguindo as recomendações do fabricante Immulite Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics Inc



- EUA). Os valores de T4 total foram expressos em  $\mu\text{g/dL}$ , enquanto os valores de T3 total e T4 livre foram apresentados em  $\text{ng/dL}$ .

### **3.14 Determinação de leucócitos totais**

A determinação global de leucócitos sanguíneos foi realizada após o 11<sup>o</sup> dia pós infecção em todos os animais de cada grupo experimental. Para isso, amostras de sangue foram diluídas com o líquido de Turk, composto por ácido acético (lise de hemácias) e violeta de genciana 1% (cora os leucócitos). A diluição ocorreu na razão de 1/20, seguido de montagem de câmara de Neubauer, para determinação de leucócitos com auxílio de microscópio óptico (objetiva no aumento de 10 vezes). A seguir, a contagem ocorreu nos 4 quadrantes externos da câmara de Neubauer. Obtém-se o resultado por meio da seguinte fórmula:  $\text{Leucócitos/mm}^3 = (\text{leucócitos contados} \times \text{fator da diluição} \times 10) \div 4$ .

### **3.15 Quantificação de plaquetas**

A contagem de plaquetas foi realizada pela técnica de Brecher (BRECHER; CRONKITE, 1950). Para isso, utiliza-se 1,0g de oxalato de amônia, 2 gotas de azul de metileno a 1% em 100 mL de água destilada como diluente. A diluição utilizada foi de 1/200 da amostra de sangue em relação ao líquido diluidor, seguido de auxílio de câmara de Neubauer e microscopia óptica (objetiva no aumento de 40 vezes) para determinação. Posteriormente, 25 quadrantes do retículo central da câmara foram determinados utilizando contador manual. Os resultados da contagem foram expressos em número de plaquetas por volume de sangue ( $\text{plaquetas/mm}^3$ ), após a realização da seguinte equação:  $\text{N}^{\circ} \text{ de plaquetas/mm}^3 = \text{N}^{\circ} \text{ de plaquetas contadas} \times 1000$ .

### **3.16 Determinação de hematócrito**

O hematócrito (Ht) consiste na relação volume ocupado por eritrócitos em um volume de sangue total. Os valores de Ht foram determinados após o 11<sup>o</sup> de infecção, através da coleta de sangue total de todos os animais de cada grupo experimental. Para isso, tubos de capilares simples foram enchidos com sangue total com

anticoagulante, até que se falte 1 cm para completar o capilar. Em seguida, a extremidade vazia do tubo foi vedada com a massa de vedação. Os capilares foram colocados em centrífuga de hematócrito com a extremidade aberta para o centro desta. Após a centrifugação por 5 minutos em 11.000 rpm, a percentagem foi determinada com auxílio do cartão de leitura de hematócrito. Os valores foram expressos em %.

### **3.17 Contagem global de eritrócitos**

A determinação global de eritrócitos foi realizada com auxílio do líquido de Hayem. Esse líquido, tem em sua formulação cloreto de sódio e sulfato de sódio que conferem o caráter isotônico; o sulfato de sódio atua também com anticoagulante. Outro componente é o cloreto de mercúrio que além de apresentar atividade antifúngica e antibacteriana, promove a lise de leucócitos, pelo aumento de permeabilidade de membrana, o que favorece a segregação de hemácias. Basicamente, o sangue de todos os animais foi diluído na proporção 1/200 com o líquido de Hayem, seguido da montagem de câmara de Neubauer. A seguir, 5 quadrados do retículo central foram determinados com auxílio de contador manual. A contagem foi realizada com a objetiva do microscópio no aumento de 40 vezes. O resultado foi expresso em número de eritrócitos por volume de sangue (hemácias/mm<sup>3</sup>). Para a obtenção de contagem global de eritrócitos, utilizou-se a seguinte equação:  $N^{\circ} \text{ eritrócitos/mm}^3 = N^{\circ} \text{ eritrócitos contados} \times N^{\circ} \text{ quadrados contados (5)} \times \text{diluição da amostra (200)} \times \text{fator de correção (10)}$ .

### **3.18 Determinação de hemoglobina**

A determinação de hemoglobina foi realizada pelo método cianometahemoglobina, que se baseia na absorção espectrofotométrica de uma solução de cianeto de potássio e ferricianeto de potássio, chamada de Drabkin (1.0g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,05g de KCN, 0,2g de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> e 1000ml de água destilada). A determinação de hemoglobina ocorre através da oxidação à metemoglobina pelo ferricianeto de potássio, e depois a cianometemoglobina pelo cianeto de potássio. A formação de cianometemoglobina é diretamente proporcional a concentração de hemoglobina, e pode ser quantificada por espectrofotometria. Subsequentemente à

eutanásia dos animais após o 11<sup>o</sup> dia de infecção, 20µL de sangue total foram colhidos sem auxílio de anticoagulante, e adicionados a 5 mL de solução Drabkin. Depois de homogeneização e repouso por 10 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda 540nm. Os valores de hemoglobina foram expressos em g/dL.

### **3.19 Quantificação de citocinas e quimiocinas**

Amostras de soro foram utilizadas para detecção de IFN-γ, IL-17A e IL-2 por meio de ensaio imunoenzimático ELISA do tipo *Sandwich*, utilizando kit comercial (R&D systems e Biosciences), de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura da reação colorimétrica foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas (BIOTEK SYNERGY H1M). O kit de ensaio Multiplex MILLIPLEX (Cat.# RECYTMAG-65K Millipore) e o sistema de multiplexação MAGPIX (MilliporeSigma) foram usados para a detecção de IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-18, IL-12p70, GM-CSF, C-CSF, MIP-1α, MIP-2α, MCP-1, CXCL-1, CCL-5 e CXCL-10.

### **3.20 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc., San Diego CA, EUA), e os testes utilizados foram: *One Way ANOVA*, seguido pelo pós teste Bonferroni ou teste *t* de *Student* (figura 2 e figura 3). Valores de P iguais ou menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

***RESULTADOS***

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Tratamento com metimazol em ratos**

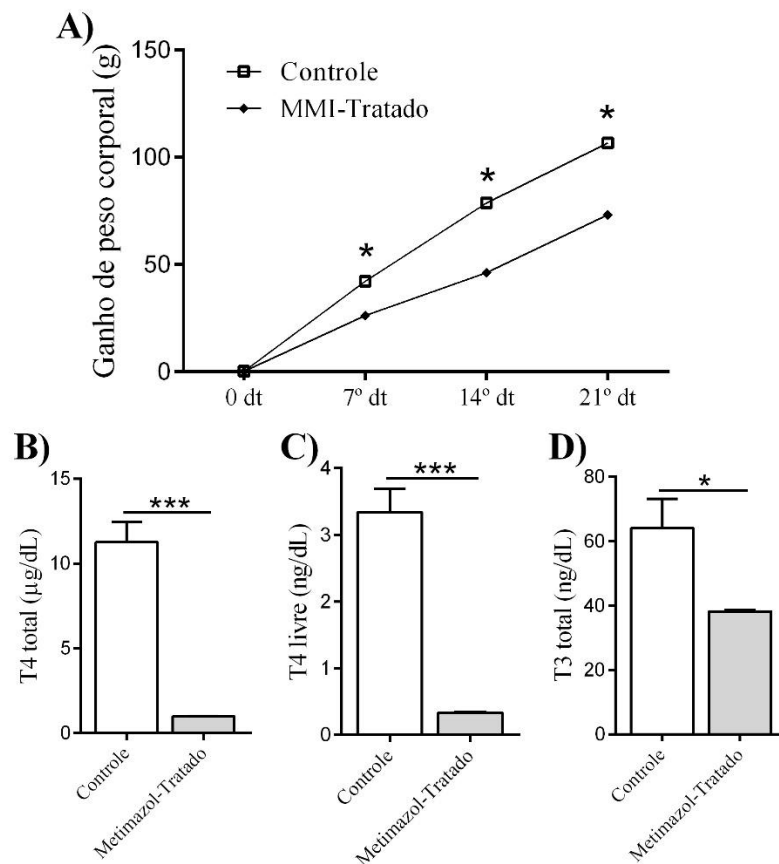
A fim de atestar o quadro de hipotireoidismo em modelo animal após o tratamento com metimazol, uma alíquota de sangue da cauda dos animais foi coletada e a produção de hormônios associados a função tireoidiana foi investigada. Conforme demonstrado na figura 2, os níveis plasmáticos de T4 total (fig. 2B), T4 livre (fig. 2C) e T3 total (fig. 2D) se encontravam significativamente diminuídos em animais submetidos ao uso de metimazol, quando comparado aos animais controle não tratados, o que confirma o quadro de hipotireoidismo em nosso modelo experimental.

Durante as 3 semanas de tratamento farmacológico, o ganho de peso dos animais foi avaliado semanalmente (fig. 2A). Observou-se que ratos submetidos ao tratamento com metimazol, apresentaram menor ganho de peso corporal em relação ao grupo controle.

### **4.2 Impacto do hipotireoidismo na parasitemia**

A contagem de parasitos na amostra de sangue dos animais hipotireoideos e infectados foi realizada no 7º (fig. 3A) e 9º (fig. 3B) dia após a infecção, seguindo as orientações do método de Brener (BRENER, 1962). Nenhuma diferença foi observada no número de tripomastigotas sanguícolas, entre os grupos investigados.

**Figura 2. Efeito farmacológico do tratamento com metimazol em ratos.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos foram submetidos ao tratamento farmacológico por 21 dias consecutivos com 0,02% de metimazol diluídos em água de beber, enquanto o grupo controle recebeu apenas água. O ganho de peso dos animais foi avaliado semanalmente (A), e ao final do tratamento, uma alíquota de sangue da cauda dos animais foi coletada para realização de dosagens hormonais de T4 total (B), T4 livre (C) e T3 total (D) no soro. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo). Student's t-test foi utilizado para análise estatística (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001).



### 4.3 Consequência da hipofunção tireoidiana na saúde dos órgãos durante a fase aguda da doença de Chagas

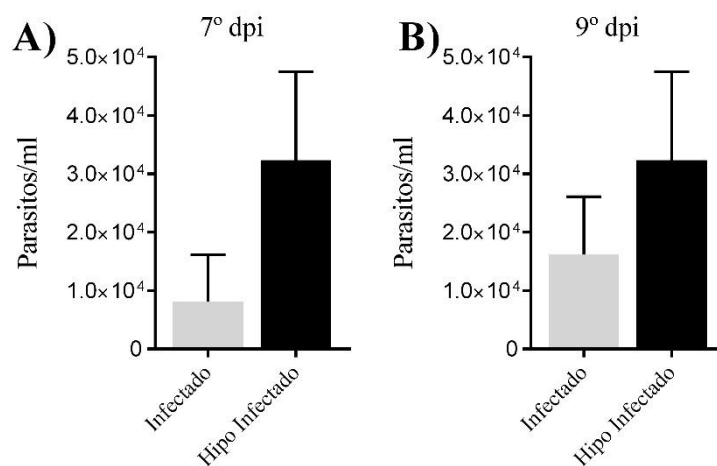
Para avaliar a influência da infecção por *T. cruzi* e/ou o impacto do hipotireoidismo na saúde dos animais, o peso relativo de órgãos foi avaliado. O motivo dessa investigação é que *T. cruzi* apresenta tropismo para diversos órgãos além do fato que os hormônios tireoidianos desempenham papel importante no crescimento e desenvolvimento tecidual (BASSETT; WILLIAMS, 2016; PEREIRA et al., 2002; SILVA PEREIRA et al., 2019). Os dados relativos à Figura 4, foram gerados após a coleta de

órgãos realizada no 11º dia após a infecção de animais de todos os grupos experimentais.

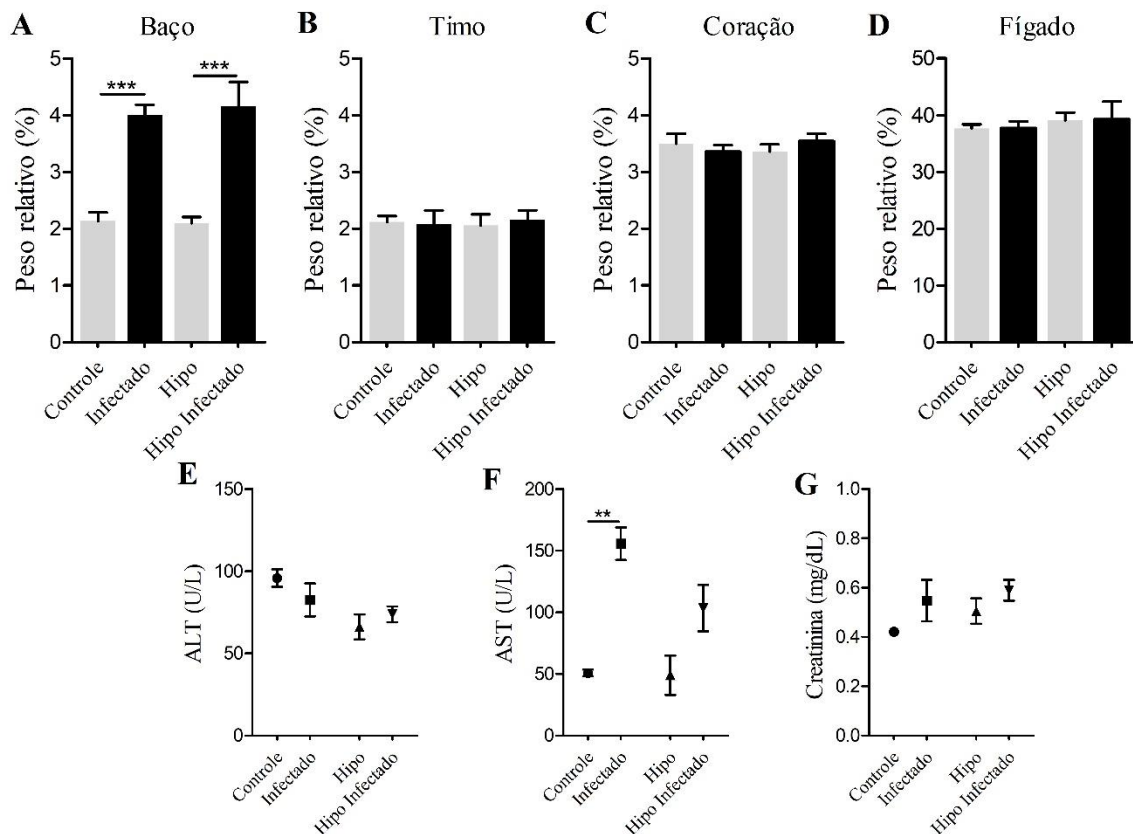
A esplenomegalia é uma alteração comumente descrita entre os indivíduos acometidos pela fase aguda da doença de Chagas (DIAS et al., 2016). Nesse sentido, animais infectados apresentaram expressivo aumento no peso do baço comparado aos não infectados, porém, o hipotireoidismo não exerceu influência nesse parâmetro (fig. 4A). Relativo ao timo (fig. 4B), fígado (fig. 4C) e coração (fig. 4D), não houve diferença entre os grupos analisados.

Em seguida, avaliamos a relação entre as patologias do hipotireoidismo e doença de Chagas, quanto a marcadores de lesão hepática e renal. Para isso, os níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatinina foram determinados entre todos os grupos experimentais. A infecção por *T. cruzi* promoveu aumento na expressão de AST, porém entre os animais hipotireoideos, a infecção não alterou esse marcador (fig. 4F). A infecção chagásica, o hipotireoidismo, ou as associações das duas comorbidades, não afetou os níveis plasmáticos de ALT (fig. 4E) e creatinina (fig. 4G).

**Figura 03. Análise de parasitemia.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 7º (A) e 9º (B) dia de infecção, amostras de sangue periférico foram coletadas para determinação de carga parasitária pelo método de Brenner. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 5$  animais/grupo) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ ). Student's t-test foi utilizado para análise estatística.



**Figura 04. Consequência do hipotireoidismo na saúde de órgãos durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os órgãos coletados para análise de peso relativo do baço (A), timo (B), coração (C) e fígado (D). Dosagens de marcadores de lesão tecidual como ALT (E), AST (F) e creatinina (G) foram realizadas no plasma dos animais. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 5$  animais/grupo) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ ). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



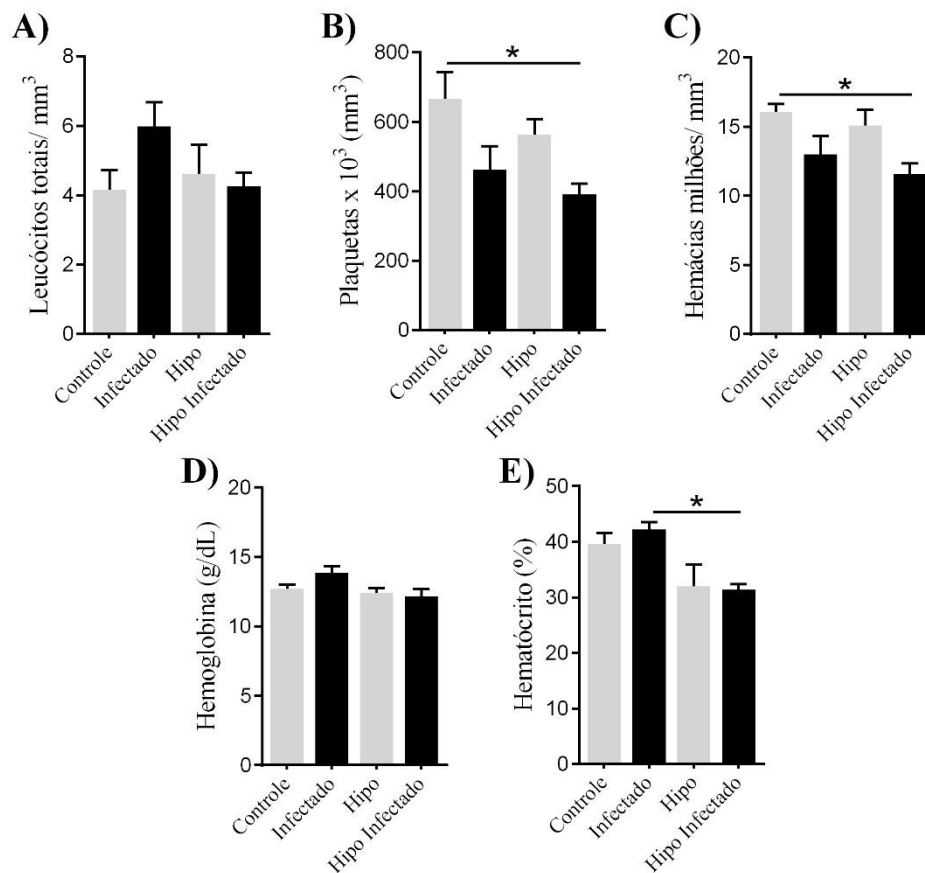
#### 4.4 Avaliação de parâmetros hematológicos

Parâmetros hematológicos e celulares foram avaliados a seguir em nosso trabalho. O hipotireoidismo, a infecção por *T. cruzi*, ou a associação das comorbidades, não interferiram no número total de leucócitos sanguíneos (fig. 5A). Contudo, em relação ao número de plaquetas (fig. 5B) e hemácias (fig. 5C) uma plaquetopenia e eritropenia significativa foi observada entre os animais hipo infectados



quando comparado ao grupo controle não infectados e não hipotireoideos, o que sugere impacto prejudicial das patologias quando associadas. Quanto aos valores de hemoglobina, não houve diferença entre os grupos investigados (fig. 5D). Por fim, avaliamos a porcentagem de hematócrito entre os grupos experimentais. Animais hipo infectados apresentaram valores significativamente baixos de hematócrito quando comparados ao grupo infectado (fig. 5E).

**Figura 05. Impacto do hipotireoidismo em parâmetros hematológicos durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas para análise de leucócitos totais (A), plaquetas (B), hemácias (C), hemoglobina (D) e hematócrito (E). Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.

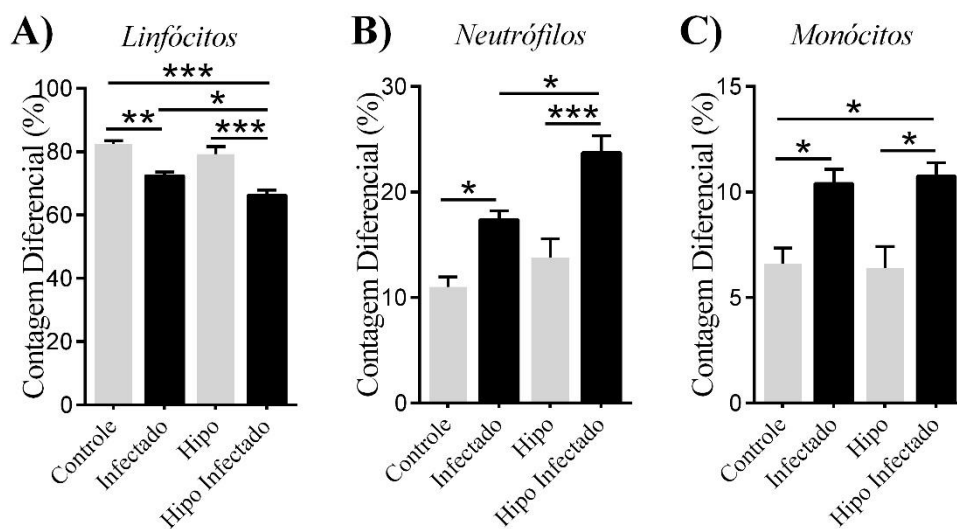


#### 4.5 Contagem diferencial para determinação de diferentes populações de leucócitos sanguíneos

Como próximo passo, a frequência de linfócitos, neutrófilos e monócitos sanguíneos foi caracterizada pela técnica de contagem diferencial pelo método panótico. Uma redução significativa na porcentagem de linfócitos foi testificada entre animais infectados em comparação aos não infectados. De forma interessante, entre os grupos infectados, o hipotireoidismo acentuou a diminuição na frequência de linfócitos sanguíneos (fig. 6A).

Em contrapartida, a porcentagem de neutrófilos (fig. 6B) e monócitos (fig. 6C) foi regulada positivamente pela infecção por *T. cruzi*. Animais hipotireoideos infectados, apresentam aumento na frequência de neutrófilos em relação ao grupo apenas infectado (fig. 6B).

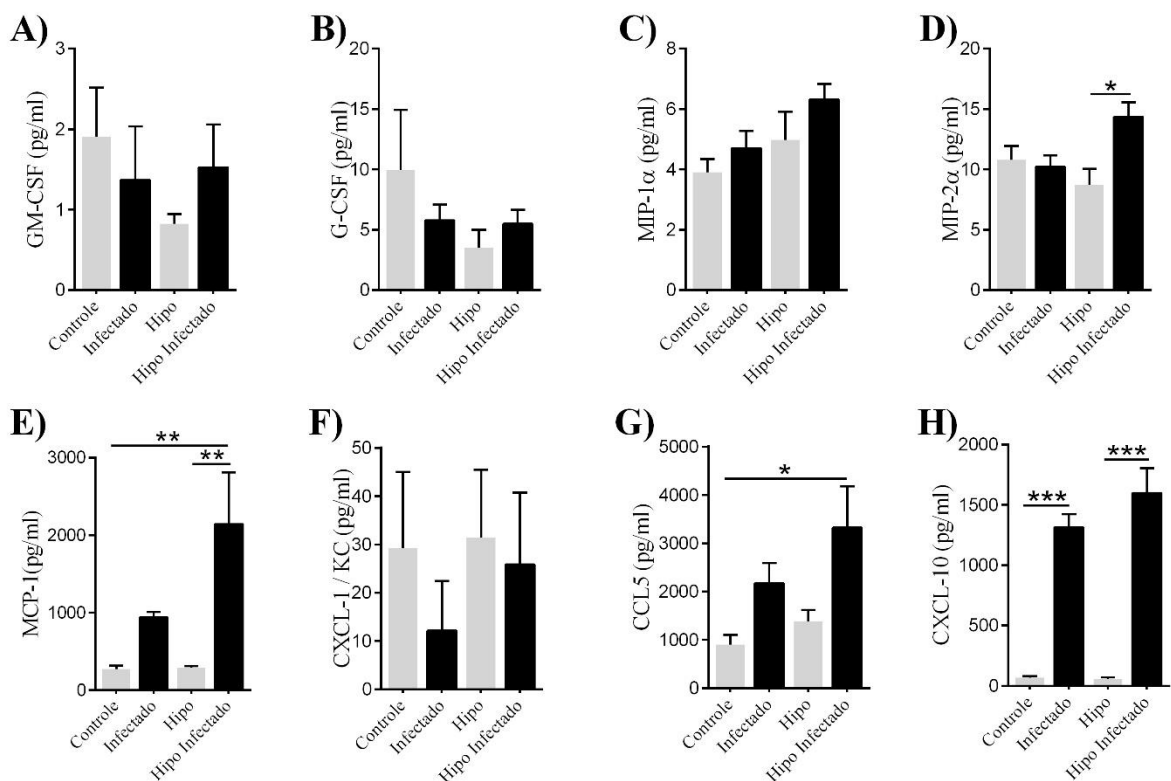
**Figura 06. Efeito do hipotireoidismo na contagem diferencial de células sanguíneas durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11<sup>o</sup> dia de infecção, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue foram coletadas para determinação da frequência de linfócitos (A), neutrófilos (B) e monócitos (C) pelo teste panótico. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



#### 4.6 Quantificação de quimiocinas plasmáticas

A partir da modulação de células sanguíneas observadas na figura 06, buscamos compreender se a doença de Chagas, o hipotireoidismo, ou a associação das duas patologias interferem na produção de quimiocinas plasmáticas. Nenhuma alteração foi observada na produção de mediadores como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos - GM-CSF (fig. 7A), o fator estimulante de colônia de granulócitos - G-CSF (fig. 7B), MIP-1 $\alpha$  (fig. 7C) e CXCL-1 (fig. 7F). No entanto, em condições de hipotireoidismo, a infecção por *T. cruzi*, promoveu a geração da quimiocina MIP-2 $\alpha$  (fig. 7D). Em relação a MCP-1, animais hipo infectados, apresentaram níveis elevados desse mediador, comparados aos hipo não infectados e ao grupo controle (fig. 7E). Já quanto ao CCL5, houve regulação positiva dessa quimiocina entre o grupo hipo infectado e os animais controle sem infecção e sem hipotireoidismo (fig. 7G). Por fim, a infecção por *T. cruzi* conferiu elevada produção de CXCL-10 (fig. 7H), sem nenhuma interferência do hipotireoidismo na modulação desse mediador.

**Figura 07. Consequência do hipotireoidismo na modulação de quimiocinas e fatores de crescimento durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e amostras de soro foram coletadas para determinação das concentrações de GM-CSF (A), G-CSF (B), MIP-1 $\alpha$  (C), MIP-2 $\alpha$  (D), MCP-1 (E), CXCL-1/KC (F), CCL5 (G) e CXCL-10 (H) pelo método multiplex baseado em beads. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



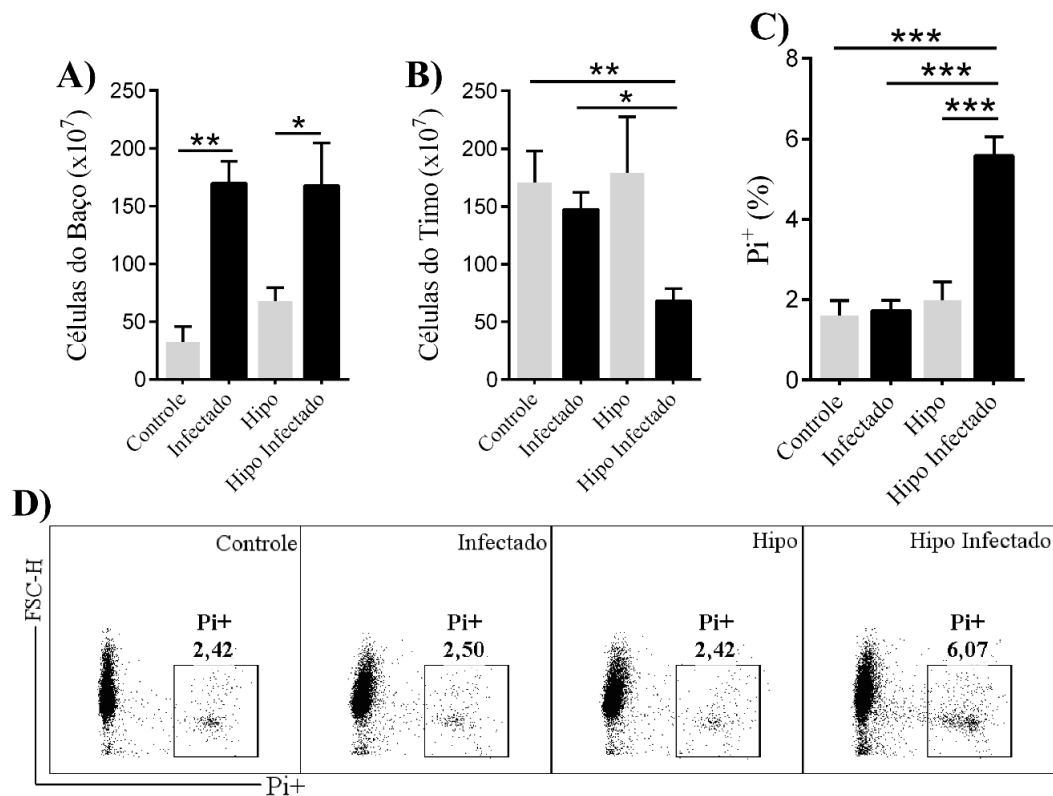
#### 4.7 Determinação da celularidade do baço e timo

Considerando a esplenomegalia observada em animais infectados por *T. cruzi* (fig. 4A), buscamos avaliar também o impacto da infecção e do hipotireoidismo no número de células do baço dos animais em nosso modelo experimental. Dessa forma, encontramos aumento no número total de células esplênicas entre animais infectados, tanto em condições controle, quanto entre os hipotireoideos (fig. 8A). Porém, o hipotireoidismo não exerceu influência na celularidade do baço.

Embora nenhuma alteração no peso do timo entre os grupos foi encontrada (Fig.4B), em seguida, determinamos o impacto das patologias estudadas no número de células desse órgão. De maneira interessante, uma redução significativamente importante de células tímicas foi observada entre os animais hipo infectados, em relação aos infectados ou ao grupo controle (fig. 8B).

Para descartar ou confirmar possível indução de morte celular em células do timo pelo hipotireoidismo, exploramos a expressão de iodeto de propídeo (Pi) por citometria de fluxo. Como observado no gráfico (fig. 8C) e na figura representativa (fig. 8D), houve aumento de células tímicas em animais hipo infectados positivas para Pi quando comparado a todos os outros grupos experimentais, fato esse, que testifica a indução de morte celular no timo, em consequência do hipotireoidismo, na infecção aguda da doença de Chagas.

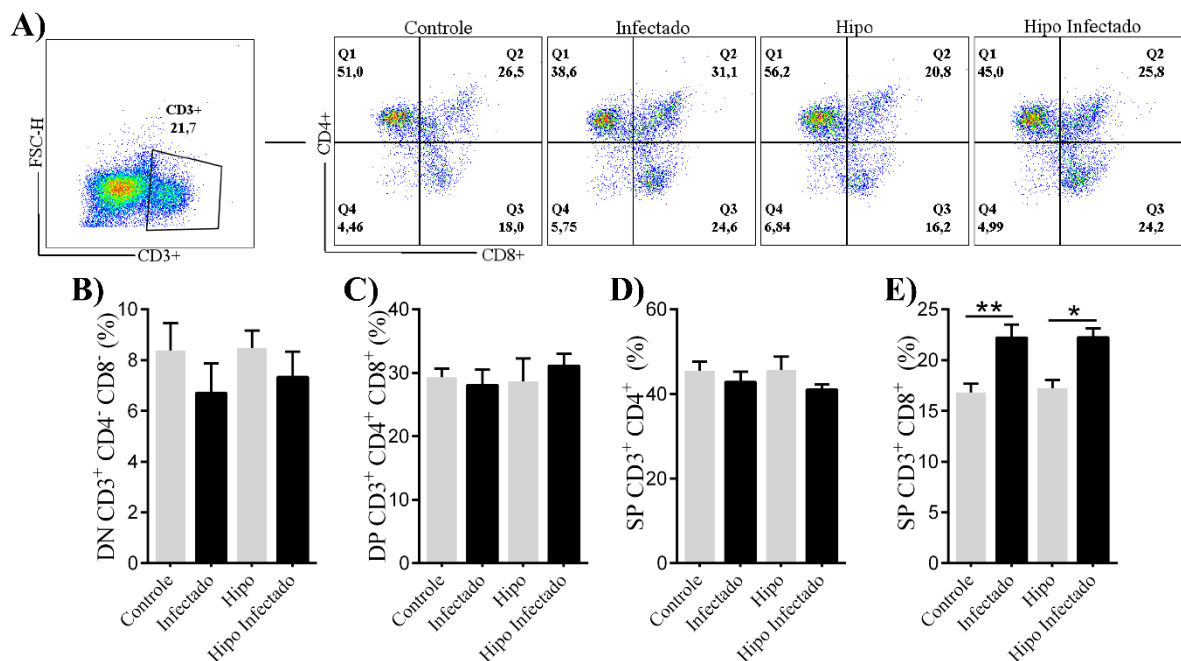
**Figura 8. Impacto do hipotireoidismo na contagem de células do baço e timo na fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e o baço e timo foram coletados para análises. O número total de células do baço (A) e timo (B) foram determinadas. Para análise de citometria de fluxo, as células do timo foram marcadas com iodeto de propídeo ( $Pi^+$ ), como demonstrado no gráfico (C) e na figura representativa (D). Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 5$  animais/grupo) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ ). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste /Bonferroni's como estratégia estatística.



#### 4.8 Maturação de linfócitos no timo

Após os dados de morte celular no timo observados na figura 08, buscamos compreender se o hipotireoidismo na fase aguda da doença de Chagas também poderia interferir na maturação de linfócitos. Para isso, o timo dos animais foram coletados após o 11<sup>o</sup> dia de infecção, as células foram processadas e marcadas com anticorpos monoclonais para determinação de células simples positivas ( $CD3^+CD4^+CD8^-$  ou  $CD3^+CD4^-CD8^+$ ), duplo negativas ( $CD3^+CD4^-CD8^-$ ) ou duplo positivas ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ). Nenhuma diferença foi encontrada entre as células duplo negativas (fig. 9B), duplo positivas (fig. 9C) e simples positivas para CD4 (fig. 9D). No entanto, a infecção por *T. cruzi* intensificou a frequência de células simples positivas para CD8 (fig. 9E), sem nenhum impacto do hipotireoidismo nesse parâmetro. Todas essas estratégias de gate, podem ser conferidas na figura 9A.

**Figura 9. Impacto do hipotireoidismo na maturação de linfócitos no timo durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os timos foram coletados e processados para análise de citometria de fluxo, conforme demonstrado na figura representativa (A). Células duplo negativo  $CD3^+CD4^-CD8^-$  (B), duplo positivo  $CD3^+CD4^+CD8^+$  (C), simples positivo  $CD3^+CD4^+$  (D) e simples positivo  $CD3^+CD8^+$  (E) foram determinadas. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 5$  animais/grupo) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ ). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



#### 4.9 Determinação da frequência de linfócitos T no baço

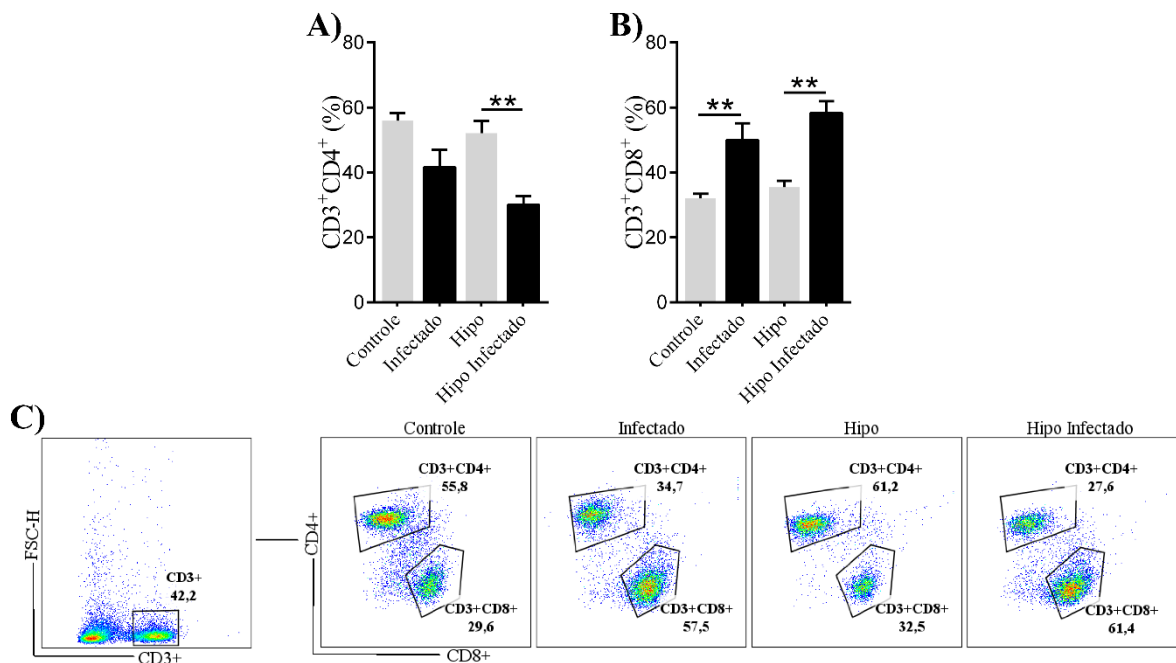
O baço é um importante órgão do sistema linfático, com participação fundamental no controle de infecções sistêmicas à antígenos circulantes, pela ativação de células imunes (CRANE; LIU; CHADBURN, 2021). Aqui, buscamos compreender o impacto da hipofunção tireoidiana em células imunes do baço, durante a infecção aguda por *T. cruzi*.

Para isso, após o processamento do tecido esplênico dos animais, as células foram isoladas e marcadas com anticorpos monoclonais para posterior fenotipagem.



Inicialmente, determinamos a frequência de linfócitos T de perfil CD4 e CD8. Conforme apresentado na figura 10A, animais hipo infectados apresentaram menor porcentagem de células TCD4 do que os hipotireoideos. A infecção por *T. cruzi* promoveu aumento de células TCD8 em animais controles ou hipotireoideos (fig. 10B), mas não ocorreu interferência do hipotireoidismo nessa população celular. A figura 10C representa a análise de citometria realizada para fenotipagem de linfócitos no baço.

**Figura 10. Influência do hipotireoidismo na frequência de linfócitos T no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os baços foram coletados e processados para análise de citometria de fluxo. A frequência de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A) e linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B) foram determinados, conforme demonstrado na figura representativa (C). Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.

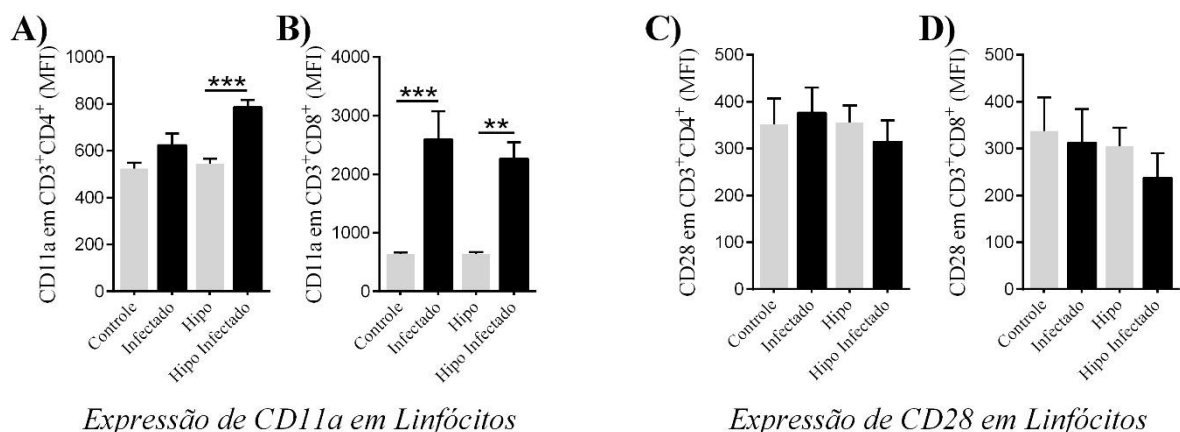


#### 4.10 Avaliação de marcadores de ativação em linfócitos T no baço

Em seguida, a expressão de moléculas de ativação em linfócitos T, como CD11a e CD28 foram determinadas. Observou-se que entre os animais hipotireoideos, a infecção chagásica promoveu aumento na expressão de CD11a em linfócitos TCD4 (fig. 11A), circunstância não encontrada entre os animais controles. No entanto, em células TCD8, a infecção por *T. cruzi* estimulou importante expressão de CD11a, seja em condição saudável ou entre os hipotireoideos (fig. 11B).

Em relação a CD28, a infecção, o hipotireoidismo, ou mesmo as patologias em coletividade, não resultaram em impacto na expressão dessa molécula em linfócitos TCD4 (fig.11C) ou em TCD8 (fig. 11D).

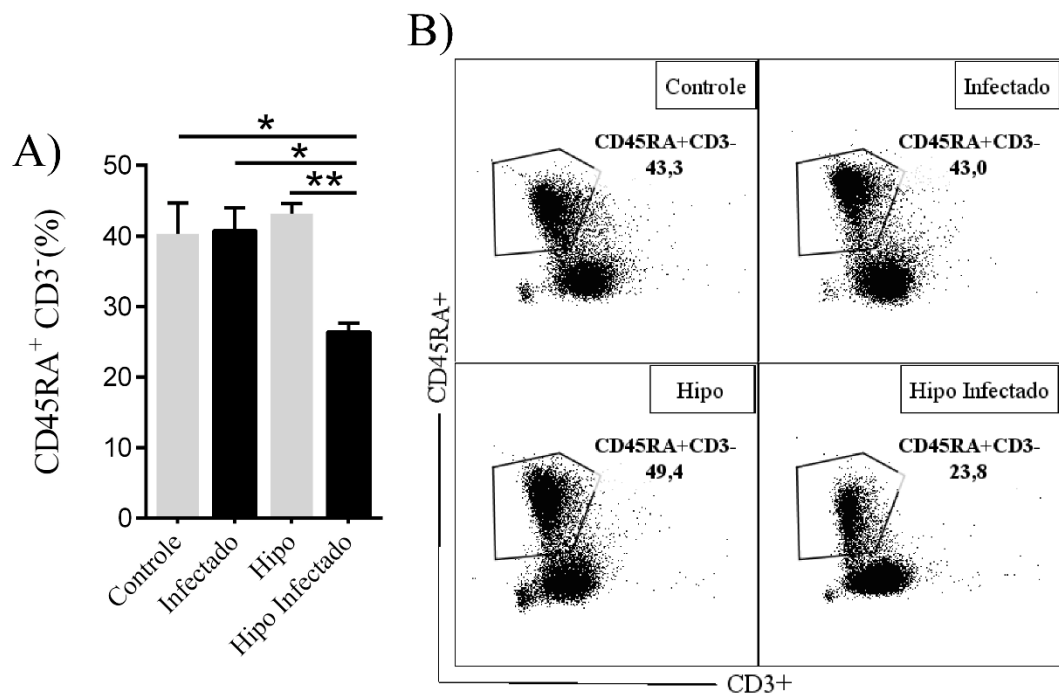
**Figura 11. Influência do hipotireoidismo na ativação de linfócitos T no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os baços foram coletados e processados para análise de citometria de fluxo. A média de intensidade de fluorescência de CD11a<sup>+</sup> em linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A) e linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (B) foram determinados, como também a média de intensidade de fluorescência de CD28<sup>+</sup> em linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (C) e linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (D). Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



#### 4.11 Determinação da frequência de linfócitos B no baço

Em virtude do papel fundamental de células B no combate à infecção por *T. cruzi* (KUMAR; TARLETON, 1998), investigamos a frequência dessas células no baço de animais controles, infectados, hipo e hipo infectados. Nossos dados sugerem forte interferência do hipotireoidismo na modulação negativa da população de linfócitos B durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, uma vez que animais hipo infectados apresentam uma redução significativa na frequência desse perfil celular, quando comparada aos controles, infectados ou aos hipotireoideos (fig. 12).

**Figura 12. Impacto do hipotireoidismo na frequência de linfócitos B no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os baços foram coletados e processados para análise de citometria de fluxo. A frequência de células  $CD45RA^+CD3^-$  (A) foram determinadas, conforme demonstrado na figura representativa (B). Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP ( $n = 5$  animais/grupo) (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ ). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



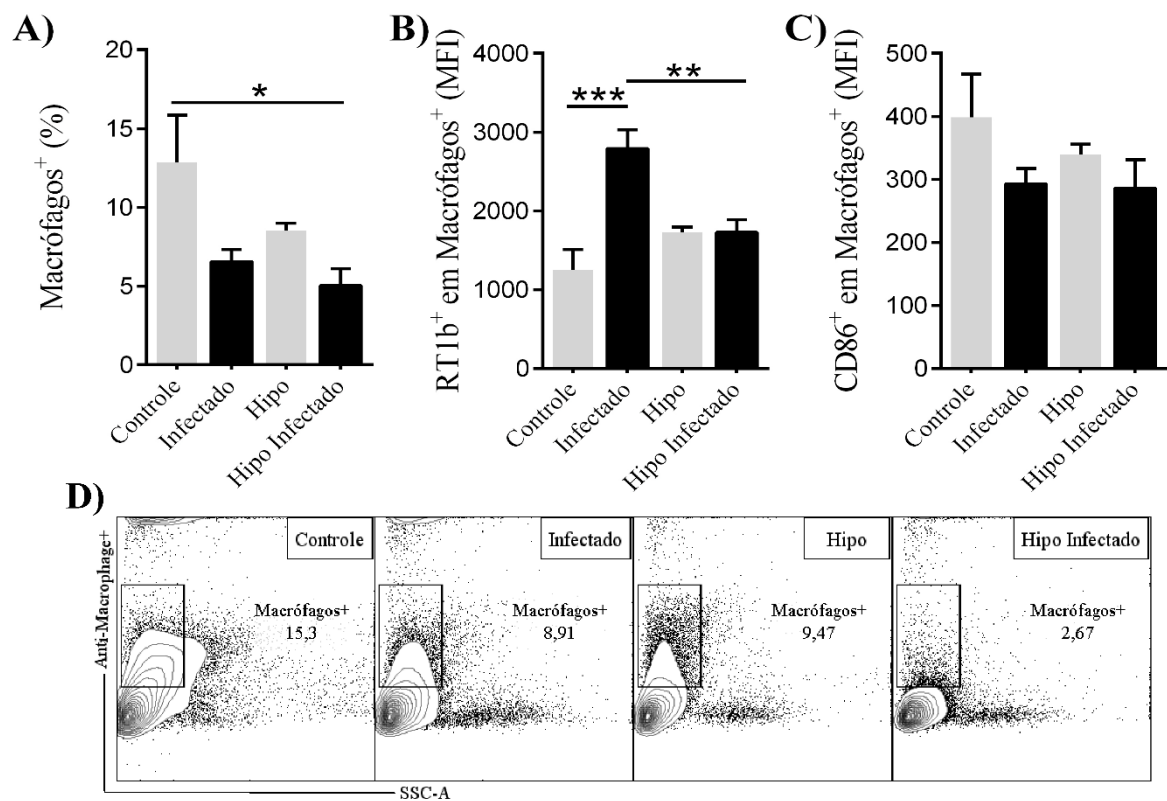
#### **4.12 Avaliação da frequência e ativação de macrófagos no baço.**

Além das células de imunidade adquirida, avaliadas nas figuras anteriores, buscamos também compreender o impacto das patologias estudadas em células de imunidade inata, como macrófagos, células dendríticas e células NK.

Desse modo, encontramos diminuição na frequência de macrófagos no baço de animais hipo infectados comparado aos controles saudáveis (fig. 13A e fig. 13D), sugerindo papel importante da integração das patologias, na disponibilidade dessas células.

Ao avaliar parâmetros de ativação em macrófagos, percebemos que a infecção por *T. cruzi* promoveu maior expressão de MHC de classe II (RT1b), porém houve redução expressiva dessa molécula pelo quadro de hipotireoidismo (fig. 13B). Já em relação a expressão de CD86 em macrófagos, não encontramos nenhuma diferença estatística perceptível entre os grupos avaliados (fig. 13C).

**Figura 13. Impacto do hipotireoidismo na frequência e ativação de macrófagos no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireóides) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os baços foram coletados e processados para análise de citometria de fluxo. A frequência de células ED-2 like<sup>+</sup> (A) e a média de intensidade de fluorescência de RT1b<sup>+</sup> (B) e CD86<sup>+</sup> (C) em macrófagos foram determinadas. A figura representativa da população de macrófagos também foi anexada (D). Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



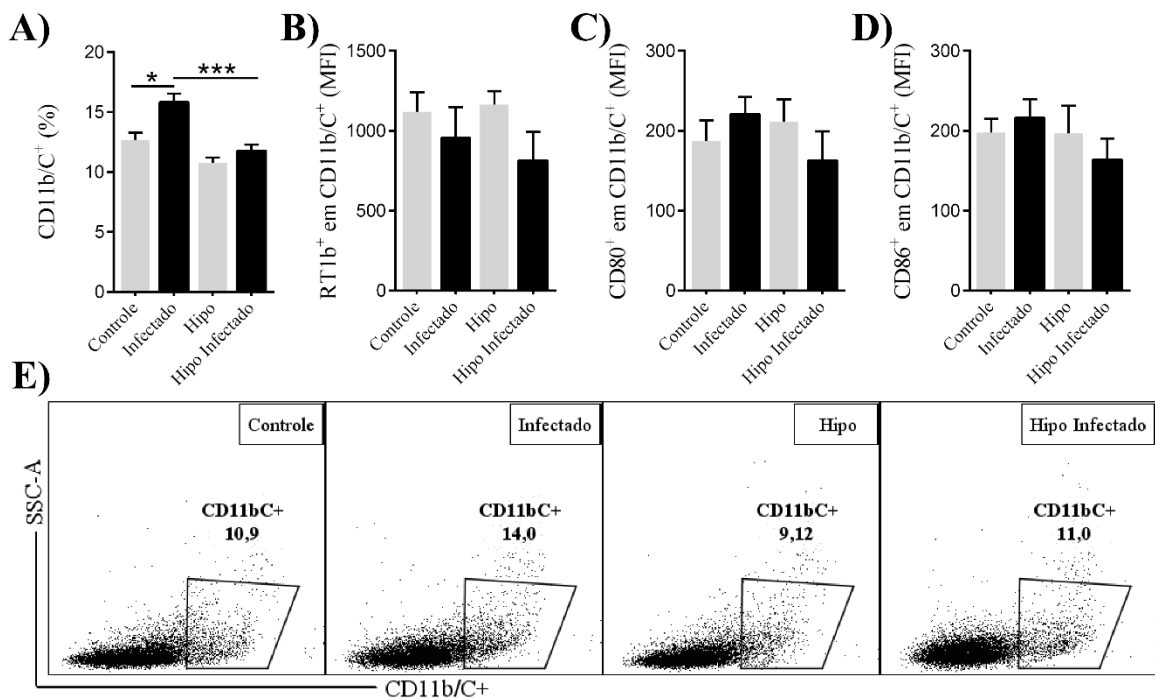
#### 4.13 Avaliação da frequência e ativação de células dendríticas no baço

Posteriormente, caracterizamos por citometria de fluxo, a frequência e os perfis de ativação de células dendríticas no baço dos animais. Conforme demonstrado na figura representativa (fig. 14E) e no gráfico de barras (fig. 14A), animais infectados, possuem maior frequência de células dendríticas do que animais não infectados. Além disso, entre os grupos infectados, o hipotireoidismo reduziu de forma significativa a

porcentagem dessas células. Dessa forma, propomos aqui, um papel regulador negativo da hipofunção tireoidiana na frequência de células dendríticas.

Ao determinar a expressão de moléculas de ativação em DCs, como RT1b (fig. 14B), CD80 (fig. 14C) e CD86 (fig. 14D), não encontramos impacto das patologias estudadas na expressão dessas moléculas.

**Figura 14. Efeito do hipotireoidismo na frequência e ativação de células dendríticas no baço durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11<sup>o</sup> dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os baços foram coletados e processados para análise de citometria de fluxo. A frequência de células CD11b/C<sup>+</sup> (A) e média de intensidade de fluorescência de RT1b<sup>+</sup> (B), CD80<sup>+</sup> (C) e CD86<sup>+</sup> (D) em células dendríticas foram determinadas. A figura representativa da população de células dendríticas também foi anexada (E). Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância One Way ANOVA foi utilizada, seguido pelo pós-teste Bonferroni's como estratégia estatística.



#### 4.14 Determinação de citocinas plasmáticas

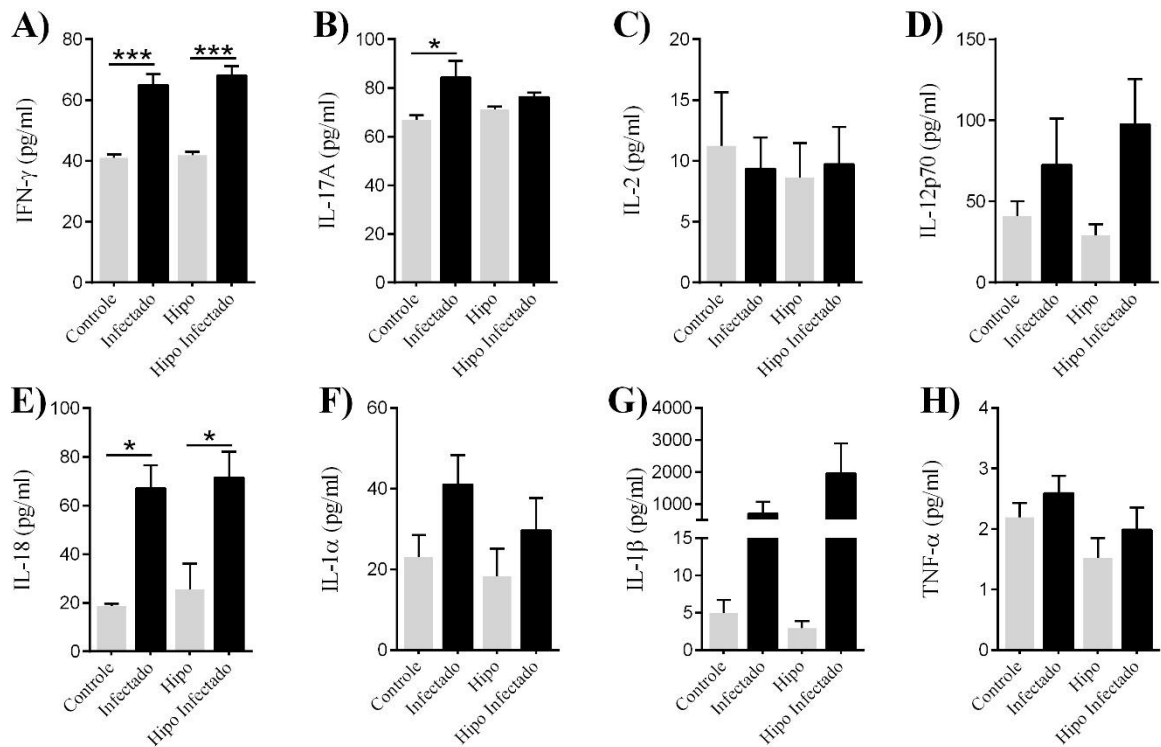
As citocinas geradas durante o processo inflamatório desencadeado pela infecção por *T. cruzi*, orquestram inúmeros parâmetros de resposta imune, como a ativação e a migração celular, e podem estar interligadas a resistência ou a suscetibilidade à infecção (DUTRA et al., 2014). Aqui, investigamos se a hipofunção tireoidiana prejudica ou promove a geração de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Os ensaios para detecção de tais citocinas, foram realizados no soro de todos os animais após o 11<sup>o</sup> dia de infecção e coleta de sangue e processamento do material biológico. Dentre os grupos de estudo, estão os animais controles, infectados, hipotireoideos e hipo infectados. Citocinas como IL-2 (fig. 15C), IL-12p70 (fig. 15D), IL-1 $\alpha$  (fig. 15F), IL-1 $\beta$  (fig. 15G), TNF- $\alpha$  (fig. 15H), IL-4 (fig. 16A) e IL-6 (fig. 16C), não foram reguladas pela infecção, hipotireoidismo ou mesmo pela associação das patologias.

Em contrapartida, observamos que a infecção por *T. cruzi* promoveu a geração de citocinas como IFN- $\gamma$  (fig. 15A) e IL-18 (fig. 15E), tanto entre os animais saudáveis quanto entre os hipotireoideos, no entanto, em relação aos níveis de IL-17A, somente entre animais normotireoideos foi possível observar uma modulação positiva da infecção chagásica na produção dessa citocina (fig. 15B). De forma interessante, em condições de hipotireoidismo, a infecção por *T. cruzi* não promoveu elevação nas quantificações de IL-17A.

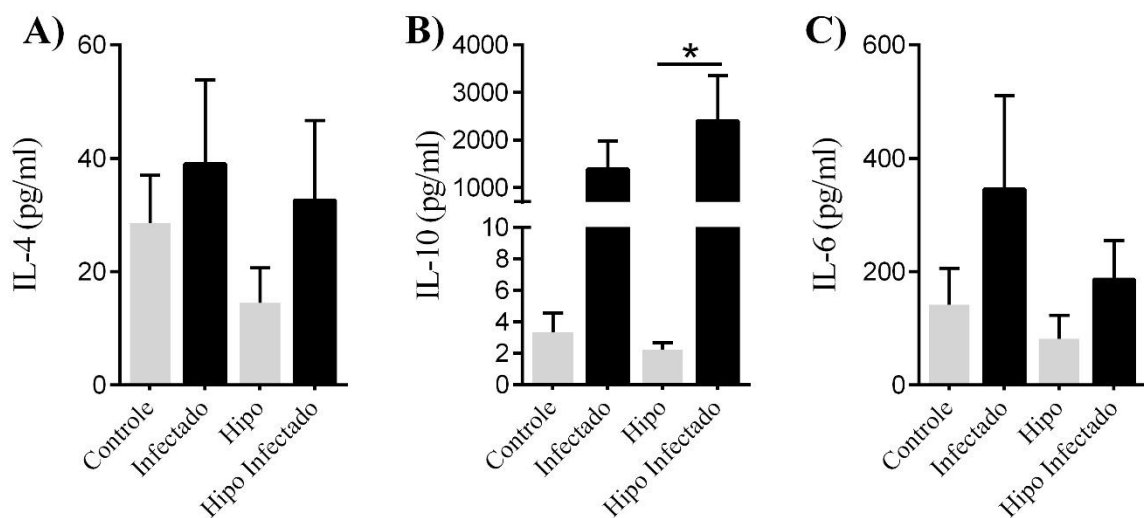
Por fim, avaliamos também a produção da citocina IL-10. Em condições de hipotireoidismo, a infecção promoveu altas concentrações desse mediador. No entanto, nenhuma diferença foi observada entre animais do grupo controle e infectado (fig. 16B).

**Figura 15. Consequência do hipotireoidismo na modulação de citocinas durante a fase aguda da doença de Chagas – Parte 1.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireóides) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e o soro foi coletado para quantificação de citocinas plasmáticas. A detecção de citocinas como IFN- $\gamma$  (A), IL-17A (B) e IL-2 (C) foram realizadas pela técnica de ELISA, enquanto as citocinas IL-12p70 (D), IL-18 (E), IL-1 $\alpha$  (F), IL-1 $\beta$  (G) e TNF- $\alpha$  (H) foram determinadas pelo método multiplex baseado em beads. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância *One Way ANOVA* foi utilizada, seguido pelo pós-teste *Bonferroni's* como estratégia estatística.





**Figura 16. Influência do hipotireoidismo na modulação de citocinas durante a fase aguda da doença de Chagas – Parte 2.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e o soro foi coletado para quantificação de citocinas plasmáticas. A detecção de IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-6 (C) foram realizadas pelo método multiplex baseado em beads. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância *One Way ANOVA* foi utilizada, seguido pelo pós-teste *Bonferroni's* como estratégia estatística.

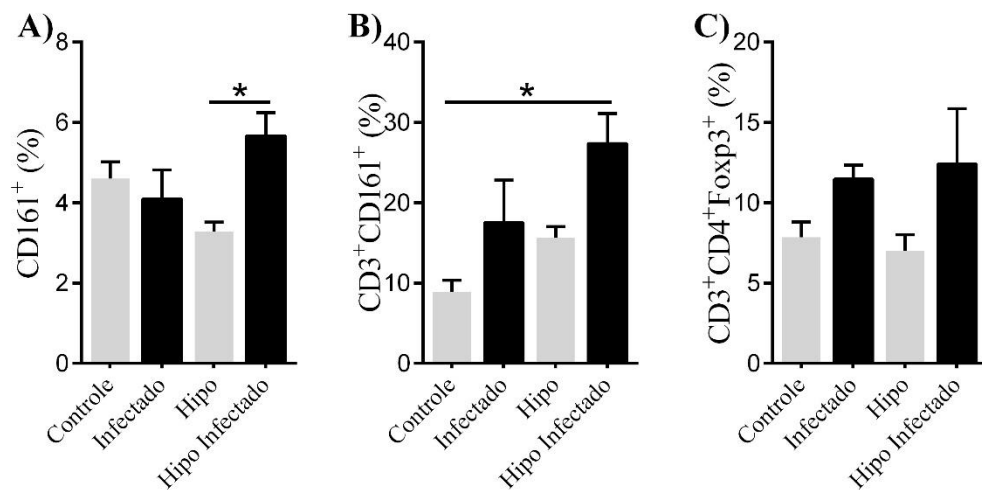


#### 4.15 Frequência de células NK, NK T e T reguladoras no baço

Por fim, determinamos a frequência de células NK, NK T e T reguladoras no baço dos animais pela técnica de citometria de fluxo. Sobre as células NK, observou-se que entre os hipotireoideos, a infecção chagásica intensificou a porcentagem dessas células, porém, entre os normotireoideos infectados e não infectados, não houve alteração nesse parâmetro (fig. 17A). Ao analisarmos as células NK T, curiosamente, observamos que animais hipo infectados apresentam aumento na frequência dessas células quando comparados aos animais saudáveis não infectados e não hipotireoideos (fig. 17B), sugerindo que a associação das duas patologias estudadas, conferem aumento dessa população celular.

Já quanto às células T reguladoras, identificadas pelos marcadores CD3/CD4/Foxp3, todos os grupos experimentais apresentaram porcentagens equivalentes desse perfil celular (fig. 17C).

**Figura 17. Influência do hipotireoidismo na frequência de células NK, NK T e T reguladoras durante a fase aguda da doença de Chagas.** Ratos de linhagem *Wistar Hannover* machos (controles e hipotireoideos) foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas de cepa Y de *T. cruzi*. No 11º dia de infecção, os animais foram eutanasiados e os baços foram coletados para fenotipagem de células por citometria de fluxo. As frequências de células CD161<sup>+</sup> (A), CD3<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> (B) e CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (C) foram determinadas. Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 5 animais/grupo) (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001). A análise de variância *One Way ANOVA* foi utilizada, seguido pelo pós-teste *Bonferroni's* como estratégia estatística.



***DISCUSSÃO***

## 5. DISCUSSÃO

Embora a doença de Chagas tenha sido descrita a mais de 100 anos (CHAGAS, 1909), a identificação de mecanismos celulares que conferem um padrão de suscetibilidade ou resistência na infecção por *Trypanosoma cruzi*, ainda é um desafio para a comunidade científica. O estudo sobre a influência do sistema endócrino na modulação imune em processos infecciosos, possibilitou importantes descobertas sobre a interação complexa e multifacetada dos sistemas biológicos (BRAZÃO et al., 2020; WENSVEEN et al., 2019). Assim, recentemente, foi sugerido papel importante dos hormônios tireoidianos no controle de infecções virais (VAREDI et al., 2014), no entanto, em doenças desencadeadas por protozoários, o impacto desses mediadores permanece incerto.

Tiroxina e triiodotironina (T4 e T3, respectivamente) são os principais hormônios gerados pela glândula tireoide e exercem funções essenciais em todos os órgãos e sistemas. A importância desse fato, pode ser observado em condições clínicas, em que pacientes acometidos por disfunções tireoidianas, como o hipertireoidismo ou o hipotireoidismo, desenvolvem alterações metabólicas importantes (CHAKER et al., 2017; GRIMM, 2019). Diversos fatores podem promover o surgimento de patologias associadas a função tireoidiana, como doenças autoimunes, ingestão excessiva ou insuficiente de iodo, ou mesmo cirurgias e terapias farmacológicas (GRIMM, 2019). Nesse contexto, de forma interessante, alguns autores no século passado, sugeriram que a infecção por *Trypanosoma cruzi*, poderia promover modificações físicas e funcionais na glândula tireoide (AZEVEDO, 1933; BESTETTI et al., 2016; LOMONACO et al., 1966), porém, o impacto das desordens tireoidianas no controle da doença de Chagas não foi investigado.

Aqui, utilizando um modelo de hipotireoidismo induzido por tratamento farmacológico em animais, buscamos compreender quais as consequências da hipofunção tireoidiana na infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*. Para isso, parâmetros imunes, parasitológicos, hematológicos e bioquímicos foram investigados em nosso modelo experimental. Inicialmente, nós e outros autores (COBOS-PUC et al., 2020; SAMPAIO et al., 2020; ZHOU et al., 2015a), confirmamos a eficácia do tratamento com metimazol, para promoção do hipotireoidismo em animais, através da redução dos níveis séricos de T3 total, T4 total e T4 livre, em animais tratados, quando comparado ao grupo controle não tratado. O metimazol atua no bloqueio da síntese

de HTs através da inibição da enzima tireoperoxidase, proteína que atua como catalizador da etapa de iodação dos resíduos de tirosina na tireoglobulina (MANNA; ROY; MUGESH, 2013).

Dentre as principais atividades dos HTs, destaca-se a ativação de receptores nucleares (TRs), com consequente regulação positiva na expressão de genes associados ao crescimento celular e tecidual (BASSETT; WILLIAMS, 2016; PASCUAL; ARANDA, 2013). Em nosso modelo experimental, observamos que animais submetidos ao tratamento com metimazol, apresentam menor ganho de peso corporal, do que animais não tratados. Evidências científicas sugerem uma importante relação entre as concentração de HTs e a manutenção de peso corporal.

Tabachnik et al., (2017) descreveram que o tratamento de animais fêmeas obesas com medicamento antitireoidiano, preveniu o ganho de peso de sua prole (TABACHNIK et al., 2017). Em estudos sobre o desenvolvimento fetal humano, as concentrações de T4 livre encontradas no cordão umbilical após o nascimento, foram proporcionais ao peso corpóreo dos indivíduos recém-nascidos (SHIELDS et al., 2011). Assim como observado em nosso trabalho, o uso contínuo de metimazol em ratos, para o estudo do hipotireoidismo na função de plaquetas, promoveu menor ganho de peso nesses animais (BALDISSARELLI et al., 2018).

Durante a infecção aguda por *T. cruzi*, encontramos expressiva esplenomegalia e aumento no número total de células do baço de animais infectados, independente do quadro de hipotireoidismo. A esplenomegalia é uma característica constante na doença de Chagas. Esse fato ocorre devido a um conjunto de fatores, que envolvem a migração de células inatas para o baço, auxiliando na produção de citocinas inflamatórias e apresentação de antígenos, o que gera ativação de células imunes adaptativas, com consequente expansão clonal de linfócitos T e B (DE MEIS et al., 2009; GAO; PEREIRA, 2001). Além da proliferação de linfócitos, outras causas, como a alta reatividade, hiperplasia de centros germinativos, e a intensa produção de anticorpos, já foram relacionadas ao ganho de peso do baço na infecção chagásica (ANDRADE, 1985; CORDEIRO; DAHIA; ANDRADE, 1997; PEREIRA et al., 1999).

As análises do baço, baseadas em autópsia de paciente crônicos para doença de Chagas, revelaram aumento de tamanho e peso do órgão, acompanhado de extensas áreas de folículos linfoides (PEREIRA et al., 2002). Dentre os achados clínicos mais frequentes observados em crianças infectadas por *T. cruzi* na Argentina,

destaca-se o aparecimento de hepatoesplenomegalia (MOYA; BASSO; MORETTI, 2005).

Ao longo dos anos, diversos autores reportaram importantes alterações hematológicas na fase aguda da doença de Chagas (CARDOSO; BRENER, 1980; IKEDE; LULE; TERRY, 1977; MARCONDES et al., 2000). Marcondes et al., (2000) encontraram reduções significativas nos valores de eritrócitos, plaquetas, e hemoglobina, bem como na porcentagem de hematócrito em camundongos infectados (no 18º dia pós infecção), quando comparados aos animais saudáveis não infectados. Ainda nesse contexto, outro estudo, demonstrou que camundongos inoculados com a cepa Y de *T. cruzi*, apresentam intensa trombocitopenia e anemia (CARDOSO; BRENER, 1980).

Ao avaliarmos parâmetros hematológicos no presente estudo, encontramos diminuição na porcentagem de hematócrito em animais hipo infectados, quando comparados aos apenas infectados, o que sugere impacto do hipotireoidismo nesse indicador, na infecção chagásica. Contudo, em relação ao número de plaquetas e eritrócitos, não houve diferença entre os animais saudáveis (não infectados e não hipotireoideos) e os infectados no 11º dia pós infecção. De forma interessante, observamos que animais hipo infectados possuem valores reduzidos de plaquetas e hemácias, em relação ao grupo controle (não infectado e normotireoideo). Uma vez que alterações plaquetárias e eritrocitárias foram descritas no 18º dia de infecção por *T. cruzi* (CARDOSO; BRENER, 1980), os nossos achados demonstram que apenas quando associados, o hipotireoidismo e a doença de Chagas, levam a uma eritrocitopenia e plaquetopenia em dias anteriores aos observados por Cardoso; Brener (1980).

Os distúrbios tireoidianos estão associados a anormalidades eritrocitárias e a alterações plaquetárias. A anemia é caracterizada por uma deficiência de glóbulos vermelhos e/ou hemoglobina (BEUTLER, 1988). Geralmente, 20-65% dos indivíduos hipotireoideos também são diagnosticadas com anemias (CHU et al., 1981; LIPPI et al., 2008). Esse fato ocorre, devido a importância dos hormônios tireoidianos no processo de síntese celular. Camundongos deficientes para TR $\alpha$ , um dos receptores específicos de ligação aos HTs, apresentam falha no processo de eritropoiese no baço durante o período neonatal (ANGELIN-DUCLOS et al., 2005), o que demonstra papel importante dos hormônios tireoidianos na manutenção e produção de glóbulos vermelhos. Por meio de uma revisão sistemática com enfoque em meta-análise, Yang

et al., (2020) constataram que o hipotireoidismo é um fator de risco para o desenvolvimento de anemia gestacional (YANG et al., 2020).

Em ensaios *in vitro* investigando os mecanismos de ativação de plaquetas humanas, foi atestado que o processo de agregação e degranulação plaquetária (liberação de ATP), ocorre diretamente sob influência de T4 (MOUSA et al., 2010). Pacientes hipertireoideos apresentam aumento de função plaquetária, quando comparado a indivíduos normotireoideos (HOMONCIK et al., 2007), o que poderia acarretar em maior risco de eventos trombóticos nesses pacientes. Um fato que fortalece essa hipótese, é que alguns fatores pró-coagulantes, como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand, já foram encontrados em níveis elevados em indivíduos acometidos pelo hipertireoidismo (LIPPI et al., 2009; STUIJVER et al., 2012).

Embora o *Trypanosoma cruzi* apresente tropismo por células gliais, fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas (BRENER, 1973), com o avanço da pesquisa científica, hoje sabe-se que o parasito pode gerar lesão tecidual em órgãos secundários, como o fígado e os rins (DE OLIVEIRA et al., 2009; NOVAES et al., 2015). Nesse contexto, ao avaliar marcadores de lesão hepática e renal em nosso modelo experimental, encontramos um aumento significativo nos níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) em animais infectados, quando comparados aos não infectados, o que sugere influência da infecção por *T. cruzi* no surgimento de lesão hepática. Em relação ao hipotireoidismo ou mesmo ao tratamento farmacológico com metimazol, nenhuma alteração foi observada na quantificação de ALT, AST e creatinina entre os grupos investigados.

Alguns autores tem demonstrado importante relação entre a infecção chagásica e a injúria hepática. Providello et al., (2018) evidenciaram que no 17º dia de infecção por *T. cruzi*, camundongos apresentam elevados níveis de ALT e AST, quando comparados aos animais saudáveis (PROVIDELLO et al., 2018). Outra pesquisa demonstrou que a infecção por *Trypanosoma cruzi* é um fator de risco para o surgimento de esteatose hepática, uma vez que o parasito pode exacerbar o processo inflamatório e intensificar a geração de mecanismos de estresse oxidativo (ONOFRIO et al., 2015). Em conformidade, pacientes acometidos pela doença de Chagas por via de infecção oral, apresentam aumento nas concentrações plasmáticas de ALT, AST e proteína C reativa (SANTOS et al., 2020).

Aqui, os nossos dados demonstram que o hipotireoidismo promove intensa morte de células tímicas durante a fase aguda da doença de Chagas. Acompanhado

desse achado, encontramos uma desregulação importante na frequência de leucócitos sanguíneos em nosso modelo experimental. A infecção por *T. cruzi* proporcionou aumento na frequência de neutrófilos e diminuição na porcentagem de linfócitos circulantes. De forma interessante, o hipotireoidismo intensificou a desregulação encontrada. Animais hipo infectados, apresentam diminuição na porcentagem de linfócitos e aumento na frequência de neutrófilos, quando comparados aos animais apenas infectados.

O timo é um órgão linfoide essencial para a geração de células imunes funcionais, devido a sua participação no processo de maturação de linfócitos T (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010). No entanto, algumas infecções e distúrbios endócrinos podem desencadear uma disfunção tímica importante. Nesse contexto, está bem estabelecido que a infecção por *T. cruzi* exerce influência direta sobre a manutenção e regulação desse órgão. Embora o processo inflamatório desencadeado nos estágios iniciais da doença de Chagas tenha real importância para o controle da infecção, alguns autores demonstraram que a produção exacerbada de TNF- $\alpha$  e corticosterona, está relacionada a um processo de exaustão tímica, acompanhado de apoptose de timócitos, atrofia do órgão e emigração de células duplo positivas para a periferia (PÉREZ et al., 2007, 2011). Desse modo, evidências clínicas, sugerem que células duplo positivas e/ou duplo negativas podem ser encontradas no sangue periférico de pacientes com a forma cardíaca grave na doença de Chagas (LEPLETIER et al., 2014; PÉREZ et al., 2020).

É importante pontuar que apenas a infecção por *Trypanosoma cruzi* não promoveu morte celular ou desregulações importantes no timo em nosso modelo experimental. Somente a associação das patologias (hipotireoidismo e doença de Chagas) desencadearam uma alta taxa de morte celular nesse órgão. Enquanto alguns autores relataram apoptose de células tímicas no 17º dia pós infecção (PÉREZ et al., 2007) em modelos animais, os nossos dados gerados em dias anteriores aos de Pérez et al., (2007), sugerem que os hormônios tireoidianos possuem papéis determinantes para a manutenção de viabilidade de células no timo em estágios iniciais da fase aguda da doença de Chagas.

Em apoio aos resultados apresentados, alguns autores demonstraram o envolvimento dos hormônios tireoidianos na fisiologia e manutenção do timo. Ratos hipotireoideos, apresentam acentuada involução tímica, caracterizada por apoptose de timócitos e uma desregulação nas populações de células epiteliais medulares e na



arquitetura morfofuncional do órgão (ABOU-RABIA; KENDALL, 1994). Em pacientes com hiperfunção tireoidiana devido a doença de Graves, foi descrito uma correlação importante entre o hipertireoidismo e o surgimento de hiperplasia tímica (POPOVENIUC et al., 2010). A timulina, também conhecida como fator tímico sérico, é um peptídeo hormonal, produzido por células epiteliais tímicas, envolvido na proliferação e diferenciação de linfócitos (REGGIANI et al., 2014). Pacientes hipotireoideos, apresentam reduções significativas nos níveis de timulina, quando comparados aos indivíduos saudáveis (FABRIS et al., 1986).

Baseado nos resultados encontrados, acreditamos que a diminuição na frequência de linfócitos e o aumento de neutrófilos na circulação de animais hipo infectados, ocorra como uma consequência da intensa morte de células tímicas nesses animais. Outros achados em nosso trabalho, também fortalecem a nossa hipótese, como por exemplo, a diminuição de linfócitos T CD4 no baço de animais hipo infectados, quando comparados aos somente hipotireoideos, e a importante redução de linfócitos B no baço de animais hipo infectados, em relação a todos os outros grupos experimentais (dado que será discutido logo mais).

Para justificar a desregulação na frequência de leucócitos circulantes observada, realizamos a dosagem de quimiocinas e fatores de crescimento no soro dos animais. Encontramos aumento na produção de MIP-2 $\alpha$  em animais hipo infectados, quando comparados aos apenas hipotireoideos. Essa quimiocina é produzida e secretada por diversos subtipos celulares, como monócitos e macrófagos, e desempenha papel importante na quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, como os neutrófilos, e também na migração de células tronco hematopoiéticas (GUO et al., 2020, p. 2; PELUS; FUKUDA, 2006, p. 2; WOLPE et al., 1989). A regulação positiva de MIP-2 $\alpha$  observada em animais hipo infectados, consolida o aumento de neutrófilos descrito nesse grupo experimental. Oliveira et al., (2004) demonstraram que a sinalização via TLR-4 é essencial para o controle de carga parasitária na infecção chagásica, de forma dependente da expressão de MIP-2 $\alpha$  e migração de neutrófilos (OLIVEIRA et al., 2004).

Outra proteína encontrada em níveis elevados em animais hipo infectados em relação aos hipo não infectados, foi a MCP-1 (do inglês - *Monocyte Chemoattractant Protein-1*). Essa quimiocina participa da quimiotaxia de monócitos e macrófagos (DESHMANE et al., 2009). Em concordância com esse resultado, observamos aumento de monócitos circulantes, entre os animais infectados e não infectados, tanto

em condição de hipotireoidismo, como também entre os animais com função tireoidiana preservada. Na procura de biomarcadores que determinem a gravidade da doença cardíaca na doença de Chagas, foi descrito que indivíduos que apresentam manifestações sintomatológicas graves, apresentam menores níveis de MCP-1 (KEATING et al., 2015), o que indica papel protetor dessa quimiocina no prognóstico da doença de Chagas humana.

De forma interessante, observamos que a infecção por *T. cruzi* promoveu aumento na produção da quimiocina CXCL-10, de maneira independente do hipotireoidismo. Essa proteína é secretada por monócitos, queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos, sob estímulo do IFN- $\gamma$  (FALLAHI; ELIA, 2016; LUSTER; UNKELESS; RAVETCH, 1985). Alguns leucócitos como monócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas e linfócitos T, podem ser sofrer influência de CXCL-10 no processo de quimiotaxia (ANTONELLI et al., 2014; BAGHERI et al., 2020). Elevada produção de IFN- $\gamma$  foi constatada no grupo de animais infectados em nosso desenho experimental, dado esse, que fortalece o aumento de CXCL-10 encontrado no soro dos mesmos animais.

Dentre os parâmetros imunes investigados, quantificamos a frequência de linfócitos T de perfil CD8 no baço dos animais por citometria de fluxo. Observamos que a infecção por *T. cruzi* promoveu o aumento dessas células, tanto em animais normotireoideos, quanto entre os ratos hipotireoideos, o que exclui a participação do hipotireoidismo na modulação de frequência linfócitos T CD8 no baço durante a fase aguda da doença de Chagas. Outro dado que fortalece esse resultado, foi observado durante a maturação de linfócitos no timo. Encontramos uma frequência elevada de células simples positivas para CD8 em animais infectados, tanto entre os controles, quanto entre os animais hipotireoideos, em relação aos não infectados, dado que justifica o aumento dessas células encontrados em órgãos periféricos, como o baço.

Os linfócitos T CD8 participam ativamente do processo de resistência na infecção aguda por *T. cruzi*. Essas células são fontes importantes de IFN- $\gamma$ , e desempenham papel fundamental na eliminação de células infectadas (SILVERIO et al., 2012). Dessa forma, a atividade de células T CD8 foram associadas a uma maior sobrevivência de animais infectados, e uma melhor capacidade de controle de carga parasitária na fase aguda e crônica da doença de Chagas (TARLETON, 1990; TARLETON et al., 1994).

Uma vez que nenhuma interferência do hipotireoidismo foi observada na maturação de linfócitos T no timo dos animais, buscamos a seguir, compreender o impacto das patologias aqui estudadas, no perfil de ativação de linfócitos no baço. CD11a é uma subunidade (cadeia  $\alpha$ ) da integrina LFA-1 (do inglês - *Lymphocyte function-associated antigen 1*) expressa em diversos subtipos celulares, mas que em linfócitos T, desempenha inúmeras funções, através do seu envolvimento no processo de adesão celular, sinalização co-estimulatória, ativação e proliferação (JIANG et al., 2014; PFLUGFELDER et al., 2017). A importância dessa molécula para processo inflamatório, pode ser confirmada, pelo fato de que o bloqueio de CD11a com auxílio de anticorpo humano, tem sido utilizado para minimizar os efeitos prejudiciais da ativação e migração de linfócitos em doenças autoimunes, como a psoríase, por exemplo (TALAMONTI et al., 2011). No entanto, no contexto de infecções, como na fase aguda da doença de Chagas, foi demonstrado que a integrina LFA-1 desempenha papel importante na migração de linfócitos e na resolução de parasitemia tecidual (FERREIRA et al., 2017).

Ao avaliar parâmetros de ativação em linfócitos T no baço, observamos que células T CD8 de animais infectados, apresentaram aumento na expressão de CD11a, quando comparados aos não infectados, de forma independente do hipotireoidismo. Já em células T CD4, em condição de hipotireoidismo, a infecção chagásica promoveu aumento de CD11a, porém entre os animais normotireoideos, a infecção não interferiu na expressão dessa molécula, o que supõe papel regulador negativo de HTs na expressão de CD11a em linfócitos T CD4. Uma evidência científica encontrada por Guerin et al., (1989), fortalece os nossos resultados. Os autores descreveram que pacientes com a doença de Graves, condição autoimune associada a hiperfunção tireoidiana, apresentam reduzida expressão de LFA-1 em linfócitos do sangue periférico (GUERIN et al., 1989), demonstrando correlação entre os níveis de HTs e a expressão de CD11a em linfócitos.

Linfócitos B participam do processo de resistência durante a infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*. Cardillo et al., (2007) em modelos experimentais, demonstraram que animais deficientes em linfócitos B, apresentam falha no controle de carga parasitária e menor resposta inflamatória. Dentre os parâmetros descritos, destaca-se a produção reduzida de citocinas, como o IFN- $\gamma$  e a IL-12; aumento de IL-4; e diminuição de populações celulares, como os linfócitos T efetores e de memória

(CARDILLO et al., 2007). Aqui, sugerimos um papel regulador negativo do hipotireoidismo na população de linfócitos B na fase aguda da doença de Chagas.

Em concordância com os nossos resultados, evidências científicas atestam a importância dos hormônios tireoidianos no processo de maturação e proliferação de células B (FOSTER; MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 1999). Outro estudo demonstrou que o tratamento de pacientes submetidos à tireoidectomia ou a radioterapia, com injeção intramuscular de TSH recombinante, promove significativo aumento na porcentagem de células NK e linfócitos B no sangue periférico (ADAMCZEWSKI et al., 2020), o que sugere participação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide na modulação de células B. Pacientes com hiperfunção tireoidiana, ocasionada pela doença de Graves, apresentam expressivo aumento de linfócitos B CD5<sup>+</sup> no sangue periférico (IWATANI et al., 1989).

Em seguida, buscamos compreender o papel do hipotireoidismo na modulação e ativação de células imunes inatas, como macrófagos e células dendríticas, durante a infecção aguda por *T. cruzi*. Observamos que a infecção chagásica promoveu aumento na expressão de MHC II (RT1b) em macrófagos e também propiciou maior porcentagem de células dendríticas no baço dos animais, porém, a condição de hipotireoidismo afetou negativamente os dois parâmetros mencionados.

Considerando a importância de macrófagos e células dendríticas na apresentação de antígenos, coestimulação de linfócitos, produção de citocinas inflamatórias, bem como na habilidade de reconhecimento, fagocitose e eliminação de micro-organismos, essas células são classificadas como componentes essenciais para o controle da infecção aguda por *T. cruzi* (CAMARGO et al., 1997; CARDILLO et al., 2015; DE PINHO et al., 2014; RAMPAZO et al., 2015).

O envolvimento dos hormônios tireoidianos em células do sistema imune inato está bem estabelecido. Van Der Spek et al., (2018) observaram que a disponibilidade intracelular ideal de T3, favorece a capacidade de fagocitose e a habilidade pró-inflamatória de macrófagos (VAN DER SPEK et al., 2018). Da mesma maneira, células dendríticas expostas ao T3, adquirem um potencial inflamatório, com elevada produção de citocinas, como o IFN- $\gamma$  e a IL-17 (ALAMINO et al., 2019). Em células dendríticas humanas, a adição de T3 em cultura, acarretou em regulação positiva da expressão da molécula co-estimuladora CD86 (DEDECJUS et al., 2011). Além do papel dos HTs em perfis de ativação celular, Mooij et al., (1994) descreveram que T3 e T4 também atuam na maturação de monócitos periféricos em células dendríticas

funcionais, de forma dependente da produção de GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IL6 (MOOIJ et al., 1994).

O estudo sobre as desordens tireoidianas, também trouxe novas descobertas sobre a modulação de células inatas. Macrófagos peritoneais provenientes de animais hipotireoideos, quando estimulados em cultura com LPS, apresentam reduzida produção de proteínas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , por exemplo (LIU; TSUI; WONG, 1993). No entanto, outros autores sugerem que níveis elevados de HTs podem reduzir a resposta inflamatória nessas células. Ao avaliar o impacto do hipo ou hipertireoidismo em modelos inflamatórios desencadeados por artrite reumatoide, foi observado que macrófagos de ratos hipertireoideos apresentam significativa redução na expressão de genes inflamatórios, como IL-1 $\beta$  e MIP-1 $\alpha$  (RITTENHOUSE; REDEI, 1997).

De maneira interessante, encontramos uma maior frequência de células NK T em animais hipo infectados, quando comparados ao grupo controle. Essas células foram correlacionadas ao perfil de resistência durante a infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*, e também participam da ativação de resposta mediada por anticorpos na fase crônica da patologia. Células NK T favorecem a produção de IFN- $\gamma$  nos estágios iniciais da doença de Chagas, o que auxilia no controle da replicação parasitária. Já na fase tardia da doença, a ausência de células NK T, prejudicou a ativação de resposta imune humoral específica ao parasito (DUTHIE et al., 2002; LIEKE et al., 2004). Entre os animais hipotireoideos, percebemos que a infecção por *T. cruzi* promoveu uma maior porcentagem de células NK no baço, condição não observada entre os grupos normotireoideos. Dessa forma, os nossos achados apontam um papel regulador negativo dos hormônios tireoidianos sobre esse perfil celular.

Em contraposição aos nossos dados, alguns autores propuseram que os hormônios tireoidianos favorecem o aumento e a atividade de células NK. Animais senescentes, quando tratados com tiroxina livre, apresentam aumento no número dessas células (MAHONEY; CURRIER; MILLER, 1998). Em concordância, outra pesquisa testemunhou que o tratamento com T4 em camundongos, proporcionou maior atividade citotóxica em células natural killer, amplificando sua responsividade à citocinas e modulando o metabolismo dessas células (SHARMA; TSAI; PROFFITT, 1982). Um estudo sobre o impacto das alterações endócrinas no perfil imune de indivíduos idosos com idade entre 90 e 106 anos, demonstrou importante correlação

entre os níveis de HTs e a disponibilidade de células NK encontradas (MARIANI et al., 1999).

Outro parâmetro investigado em nosso modelo, foi o impacto do hipotireoidismo na modulação de citocinas plasmáticas, durante a fase aguda da doença de Chagas. Encontramos elevação nos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-18 em animais infectados, porém, o hipotireoidismo não interferiu na produção dessas proteínas. O IFN- $\gamma$  desempenha papel central na defesa contra o *Trypanosoma cruzi*, principalmente pela geração de óxido nítrico via iNOS, o que intensifica os mecanismos microbicidas de fagócitos (CAMARGO et al., 1997; GUTIERREZ et al., 2009). Ao longo dos anos, diversas evidências científicas atestaram a importância do IFN- $\gamma$  para o controle do parasito. Minoprio et al., (1993) confirmaram que animais resistentes ao protozoário *T. cruzi*, apresentavam alta parasitemia e mortalidade, após o tratamento para o bloqueio da atividade do IFN- $\gamma$  (MINOPRIO et al., 1993). Do mesmo modo, outro estudo sugeriu papel protetor do IFN- $\gamma$  nos dias iniciais da infecção pelo protozoário, especialmente para a prevenção do parasitismo tecidual (TORRICO et al., 1991). Dentre os mecanismos de resistência associados a ação do IFN- $\gamma$ , destaca-se a ativação de linfócitos TCD8, aumento de expressão de moléculas co-estimuladoras em APCs, e a migração e ativação de fagócitos para o sítio infeccioso (CARDILLO et al., 2015; MARTINS et al., 2004; PLANELLES et al., 2003, p. 40; REED, 1988; RODRIGUEZ; CARLIER; TRUYENS, 2012).

Em relação a IL-18 na doença de Chagas, o seu papel ainda parece ser incerto. Ensaio experimentais, demonstram que a IL-18 promove a produção de IFN- $\gamma$  na fase aguda da patologia, o que poderia auxiliar na geração de resistência no curso da infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* (MÜLLER et al., 2001, p. 12). Por outro lado, pesquisas com a cepa Colombiana de *T. cruzi*, sugeriram que a IL-18 contribui para a patogênese da doença, relacionada a exacerbação do processo inflamatório na fase crônica da doença, com o surgimento de miocardite (ESPER et al., 2014).

Sobre a interleucina-17, observamos que entre animais normotireoideos, a infecção pelo *T. cruzi* favoreceu a produção dessa citocina, entretanto, encontramos níveis semelhantes de IL-17 entre animais hipo e hipo infectados, o que sugere um papel regulador da hipofunção tireoidiana na geração de IL-17 no curso da infecção chagásica. Em evidências clínicas ou em modelos de experimentação animal, a participação da IL-17 no controle da infecção por *T. cruzi* está bem estabelecida. De maneira inédita, foi descrito em 2013, que células B após o contato inicial com o

parasito, produzem altas quantidades de IL-17, de forma independente do fator de transcrição ROR $\gamma$ T, fator esse, que favoreceu o controle da replicação parasitária (BERMEJO et al., 2013; LEÓN; LUND, 2013). Em adição, Miyazaki et al., (2010) também descreveram um papel protetor da IL-17, favorecendo um perfil de resistência ao *T. cruzi*. Animais deficientes em IL-17, apresentam maior carga parasitária, reduzida resposta inflamatória (IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), e aumento da expressão de marcadores de lesão tecidual, o que gerou intensa mortalidade dos animais (MIYAZAKI et al., 2010).

Dados clínicos revelaram que pacientes chagásicos com complicações cardíacas, possuem uma menor expressão de IL-17 em linfócitos totais, quando comparados aos indivíduos que apresentam a forma indeterminada da doença de Chagas, o que sugere papel protetor da IL-17 na prevenção de danos teciduais na fase crônica da patologia (MAGALHÃES et al., 2013). Desse modo, o conjunto desses achados, fortalecem a importância da IL-17 para o controle do processo infeccioso e para prevenção de lesão tecidual associada a infecção pelo micro-organismo.

Por fim, encontramos aumento de IL-10 em animais hipo infectados, quando comparados aos hipotireoideos não infectados. No contexto das infecções parasitárias, a IL-10 tem sido associada a promoção de um perfil de suscetibilidade. Murphy et al., (2001) ao avaliarem o impacto da IL-10 no curso da leishmaniose visceral, observaram que essa citocina regula negativamente os níveis de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico ao longo da infecção, fator decisivo para a exacerbação da replicação parasitária (MURPHY et al., 2001). Resultados semelhantes também já foram observados na doença de Chagas. Em estágios iniciais da infecção por *T. cruzi*, o aumento da produção de IL-4 e IL-10, foram relacionados a uma regulação negativa do perfil celular Th1, com consequente diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e aumento de parasitemia (BARBOSA DE OLIVEIRA et al., 1996).

De maneira contrastante, alguns autores sugerem um papel benéfico da IL-10 durante a infecção chagásica. Tosello Boarti et al., (2012) observaram que neutrófilos produtores de IL-10, são essenciais para a prevenção de danos teciduais relacionados à ativação exacerbada de linfócitos Th1 (TOSELLO BOARI et al., 2012). Na busca de identificar marcadores de resistência ou suscetibilidade na doença de Chagas humana, a análise correlativa, demonstrou que a baixa expressão de IL-10, possui relação com uma pior função cardíaca, e um prognóstico desfavorável da doença (COSTA et al., 2009).

Em diversos processos biológicos, os HTs ou as disfunções tireoidianas atuam na modulação de citocinas. Células dendríticas desafiadas com triiodotironina em cultura, produzem elevadas concentrações de IL-17 (ALAMINO et al., 2019). Em modelos animais de insuficiência hepática fulminante, o hipotireoidismo reduziu os níveis séricos de IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  (BRUCK et al., 1998), demonstrando a participação da hipofunção tireoidiana no controle do processo inflamatório.

Em contrapartida, alguns autores relataram um papel regulador negativo dos HTs na produção de citocinas. Um estudo recente, descreveu que pacientes hipotireoideos pós tireoidectomia, produzem níveis elevados de IL-6, IL-10, IL-17 e TNF- $\alpha$ , quando comparados aos indivíduos saudáveis (BALDISSARELLI et al., 2020). Em um modelo experimental de diabetes mellitus induzido com aloxana, o tratamento com T3 diminuiu significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 no tecido muscular e adiposo branco epididimal dos animais (PANVELOSKI-COSTA et al., 2016). Em ensaios de inflamação aguda, induzido pelo método de bolsa de ar em ratos, observou-se que a administração de T3 em doses de referência, proporcionou um perfil de resposta anti-inflamatório, especialmente pela diminuição de leucócitos totais, células polimorfonucleares e TNF- $\alpha$  (NIJAMPURKAR et al., 2015). Ao avaliarem o impacto dos hormônios tireoidianos em ensaios de remodelamento cardíaco, foi descrito que ratos hipotireoideos produzem mais IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , do que animais eutireoideos (HAJJE et al., 2014). Baseado nas evidências científicas apresentadas acima, conclui-se que papéis pró e anti-inflamatórios, já foram atribuídos a ação dos hormônios tireoidianos.



**CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

Em conjunto, no presente trabalho descrevemos pela primeira vez as consequências do hipotireoidismo durante a fase aguda da doença de Chagas experimental. Assim, demonstramos que parâmetros imunes protetores no curso da infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*, podem ser negativamente regulados pela hipofunção tireoidiana. Dentre os mecanismos descritos, destaca-se a indução de morte de células tímicas, com consequente desregulação na frequência de leucócitos circulantes (aumento de neutrófilos e redução de linfócitos); falha na habilidade de apresentação de antígenos por macrófagos; diminuição da frequência de células dendríticas e linfócitos B em órgão linfoide secundário; e prejuízo nas concentrações plasmáticas de IL-17.

Além disso, observamos que o hipotireoidismo e a doença de Chagas em coletividade, promovem alterações imunes e hematológicas importantes, em relação ao grupo saudável. Nesse contexto, a associação das patologias acarretaram em uma diminuição de plaquetas e eritrócitos, favorecendo a desregulação hematológica; e também proporcionaram uma menor frequência de macrófagos no baço dos animais. Surpreendentemente, atestamos que a associação das duas patologias estudadas, induzem uma regulação positiva na frequência de células NK T.

Por fim, entre os animais hipotireoideos, a infecção por *T. cruzi* promoveu uma maior produção de MIP-2 $\alpha$  e IL-10 na circulação sanguínea; intensificou o aumento da expressão de CD11a em células T CD4 no baço; e gerou uma maior frequência de células NK em órgão linfoide, indicando atividade regulatória dos HTs nos parâmetros imunes descritos.

Assim, o conjunto desses achados, sugerem papéis diversos dos hormônios tireoidianos nos estágios iniciais da doença de Chagas experimental. Os dados aqui apresentados, fornecem novas contribuições para o avanço da compreensão de mecanismos endócrinos e imunológicos, no contexto das infecções desencadeadas por protozoários.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-RABIA, N.; KENDALL, M. D. Involution of the rat thymus in experimentally induced hypothyroidism. **Cell and Tissue Research**, v. 277, n. 3, p. 447–455, set. 1994.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 231–244, nov. 1996.

ADAMCZEWSKI, Z. et al. Recombinant Human Thyroid-Stimulating Hormone Increases the Percentages of Natural Killer T Cells and B Lymphocytes in Human Peripheral Blood In Vivo. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 543845, 2020.

AITKEN, E. H.; ALEMU, A.; ROGERSON, S. J. Neutrophils and Malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3005, 2018.

ALAMINO, V. A. et al. Dendritic Cells Exposed to Triiodothyronine Deliver Pro-Inflammatory Signals and Amplify IL-17-Driven Immune Responses. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 354–367, 2019.

ALMANDOZ, J. P.; GHARIB, H. Hypothyroidism: etiology, diagnosis, and management. **The Medical Clinics of North America**, v. 96, n. 2, p. 203–221, mar. 2012.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ANDRADE, Z. A. [The pathology of Chagas disease in man]. **Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale**, v. 65 Suppl 1, p. 15–30, 1985.

ANGELIN-DUCLOS, C. et al. Thyroid hormone T3 acting through the thyroid hormone alpha receptor is necessary for implementation of erythropoiesis in the neonatal spleen environment in the mouse. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 5, p. 925–934, mar. 2005.

ANTONELLI, A. et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 3, p. 272–280, mar. 2014.

ARAUJO FURLAN, C. L. et al. Limited Foxp3+ Regulatory T Cells Response During Acute Trypanosoma cruzi Infection Is Required to Allow the Emergence of Robust Parasite-Specific CD8+ T Cell Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2555, 2018.

AZEVEDO, A. P. DE. Histologia pathologica da glandula thyreoide na fórma aguda da molestia de Chagas: (Trypanosomose americana). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 27, p. 93–138, jun. 1933.

BAGHERI, H. et al. CXCL-10: a new candidate for melanoma therapy? **Cellular Oncology (Dordrecht)**, v. 43, n. 3, p. 353–365, jun. 2020.

BALDISSARELLI, J. et al. Hypothyroidism and hyperthyroidism change ectoenzyme activity in rat platelets. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 7, p. 6249–6257, jul. 2018.

BALDISSARELLI, J. et al. Increased cytokines production and oxidative stress are related with purinergic signaling and cell survival in post-thyroidectomy hypothyroidism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 499, p. 110594, 1 jan. 2020.

BARBOSA DE OLIVEIRA, L. C. et al. Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, v. 170, n. 1, p. 41–53, 25 maio 1996.

BASSETT, J. H. D.; WILLIAMS, G. R. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. **Endocrine Reviews**, v. 37, n. 2, p. 135–187, abr. 2016.

BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, n. 1, p. 132–133, set. 2006.

BERMEJO, D. A. et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. **Nature Immunology**, v. 14, n. 5, p. 514–522, maio 2013.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.

BESTETTI, R. B. et al. Could Carlos Chagas' assumption on the relationship between goiter and chronic Chagas heart disease be correct? A historical reappraisal. **International Journal of Cardiology**, v. 202, p. 410–412, 1 jan. 2016.

BEUTLER, E. The common anemias. **JAMA**, v. 259, n. 16, p. 2433–2437, 22 abr. 1988.

BEYNON, J.; AKHTAR, S.; KEARNEY, T. Predictors of outcome in myxoedema coma. **Critical Care (London, England)**, v. 12, n. 1, p. 111, 2008.

BODIMEADE, C.; MARKS, M.; MABEY, D. Neglected tropical diseases: elimination and eradication. **Clinical Medicine (London, England)**, v. 19, n. 2, p. 157–160, mar. 2019.

BOTELLA-CARRETERO, J. I. et al. The effects of thyroid hormones on circulating markers of cell-mediated immune response, as studied in patients with differentiated thyroid carcinoma before and during thyroxine withdrawal. **European Journal of Endocrinology**, v. 153, n. 2, p. 223–230, ago. 2005.

BRAZÃO, V. et al. Melatonin down-regulates steroidal hormones, thymocyte apoptosis and inflammatory cytokines in middle-aged *T. cruzi* infected rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, p. 165914, 6 ago. 2020.

BRECHER, G.; CRONKITE, E. P. Morphology and enumeration of human blood platelets. **Journal of Applied Physiology**, v. 3, n. 6, p. 365–377, dez. 1950.

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. 389–396, dez. 1962.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma Cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, 1 out. 1973.

BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3035–3043, 4 set. 2012.

BRUCK, R. et al. Hypothyroidism minimizes liver damage and improves survival in rats with thioacetamide induced fulminant hepatic failure. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 27, n. 4, p. 1013–1020, abr. 1998.

CALABRESE, K. S. et al. Study of acute chagasic mice under immunosuppressive therapy by cyclosporin A : modulation and confocal analysis of inflammatory reaction. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 1–11, abr. 2000.

CAMARGO, M. M. et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 159, n. 12, p. 6131–6139, 15 dez. 1997.

CAMARGO, R. Y. A. et al. Prevalence of chronic autoimmune thyroiditis in the urban area neighboring a petrochemical complex and a control area in Sao Paulo, Brazil. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 61, n. 4, p. 307–312, ago. 2006.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 128–134, jan. 1996.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8<sup>+</sup> T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584–595, dez. 2007.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. ftv082, dez. 2015.

CARDOSO, J. E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma Cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, n. 3–4, p. 97–104, dez. 1980.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 1, p. 159–218, 1909.

**Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em: <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 5 out. 2018.

CHAKER, L. et al. Hypothyroidism. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1550–1562, set. 2017.

CHAPMAN, N. M.; BOOTHBY, M. R.; CHI, H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 20, n. 1, p. 55–70, jan. 2020.

CHIAMOLERA, M. I.; WONDISFORD, F. E. Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1091–1096, mar. 2009.

CHU, J. Y. et al. Anemia in children and adolescents with hypothyroidism. **Clinical Pediatrics**, v. 20, n. 11, p. 696–699, nov. 1981.

COBOS-PUC, L. et al. Cardiovascular Responses to 5-hydroxytryptamine in Methimazole-induced Hypothyroid Pithed Rats. **Archives of Medical Research**, v. 51, n. 4, p. 310–316, maio 2020.

CORDEIRO, Z. M.; DAHIA, A. C.; ANDRADE, Z. A. Kinetics of *Trypanosoma cruzi* destruction in the mouse spleen. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 3–9, fev. 1997.

COSTA, G. C. et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 3, p. 451–454, 1 fev. 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301\_suppl, p. S6–S7, 24 jun. 2010.

CRANE, G. M.; LIU, Y.-C.; CHADBURN, A. Spleen: Development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 38, n. 2, p. 112–124, mar. 2021.

DAVIS, P. J.; GOGLIA, F.; LEONARD, J. L. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 12, n. 2, p. 111–121, fev. 2016.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 5, p. e992, 2011.

DE MEIS, J. et al. Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. e417, 7 jul. 2009.

DE OLIVEIRA, G. M. et al. Acute *Trypanosoma cruzi* experimental infection induced renal ischemic/reperfusion lesion in mice. **Parasitology Research**, v. 106, n. 1, p. 111–120, dez. 2009.

- DE PINHO, R. T. et al. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 147, p. 72–80, dez. 2014.
- DEDECJUS, M. et al. Thyroid hormones influence human dendritic cells' phenotype, function, and subsets distribution. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 21, n. 5, p. 533–540, maio 2011.
- DESHMANE, S. L. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, jun. 2009.
- DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. ESP, p. 7–86, jun. 2016.
- DONG, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 39, p. 51–76, 26 abr. 2021.
- DUTHIE, M. S. et al. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycosphosphoinositol-modified surface protein. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 36–48, jan. 2002.
- DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 377–387, ago. 2014.
- ECHAVARRÍA, N. G. et al. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Current Problems in Cardiology**, v. 46, n. 3, p. 100507, mar. 2021.
- EL-SHAIKH, K. A.; GABRY, M. S.; OTHMAN, G. A. Recovery of age-dependent immunological deterioration in old mice by thyroxine treatment. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 5–6, p. 244–254, jun. 2006.
- ESPER, L. et al. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 6, p. 481–490, jun. 2014.
- FABRIS, N. et al. Thyroid Function Modulates Thymic Endocrine Activity\*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 62, n. 3, p. 474–478, mar. 1986.
- FALLAHI, P.; ELIA, G. Interferon- $\gamma$ -induced protein 10 in Dengue Virus infection. **La Clinica Terapeutica**, v. 167, n. 6, p. e186–e191, dez. 2016.
- FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L. A. On the mechanism of thyroid hormone-induced respiratory burst activity in rat polymorphonuclear leukocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 3, p. 359–363, set. 1995.
- FERREIRA, C. P. et al. LFA-1 Mediates Cytotoxicity and Tissue Migration of Specific CD8+ T Cells after Heterologous Prime-Boost Vaccination against *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1291, 2017.
- FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Medicina Clinica**, v. 148, n. 3, p. 125–131, 9 fev. 2017.



FLINK, E. B. The thyroid gland. **Environmental Health Perspectives**, v. 38, p. 55–56, abr. 1981.

FOSTER, M. P.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. Proliferation of bone marrow pro-B cells is dependent on stimulation by the pituitary/thyroid axis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 163, n. 11, p. 5883–5890, 1 dez. 1999.

FRANÇA, K.; LOTTI, T. M. Psycho-Neuro-Endocrine-Immunology: A Psychobiological Concept. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 123–134, 2017.

FRICK, L. R. et al. Involvement of thyroid hormones in the alterations of T-cell immunity and tumor progression induced by chronic stress. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 11, p. 935–942, 1 jun. 2009.

GALVÃO DA SILVA, A. P.; JACYSYN, J. F.; DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology**, v. 108, n. 2, p. 230–237, fev. 2003.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 5, p. 1503–1512, maio 2001.

GHF, S. et al. Epidemiological profile of acute Chagas disease in individuals infected by oral transmission in northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 9 nov. 2020.

GIL-JARAMILLO, N. et al. Dendritic Cells: A Double-Edged Sword in Immune Responses during Chagas Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1076, 2016.

GRIMM, D. Cell and Molecular Biology of Thyroid Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. E2895, 13 jun. 2019.

GUEDES, P. M. M. et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 4, p. e1630, 2012.

GUERIN, V. et al. Decreased lymphocyte function-associated antigen-1 molecule expression on peripheral blood lymphocytes from patients with Graves' disease. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 69, n. 3, p. 648–653, set. 1989.

GUO, L.-Y. et al. CXCL2, a new critical factor and therapeutic target for cardiovascular diseases. **Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)**, v. 42, n. 5, p. 428–437, 3 jul. 2020.

GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 151, p. 32–50, nov. 2015.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 236–245, jul. 2009.

HAJJE, G. et al. Hypothyroidism and its rapid correction alter cardiac remodeling. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109753, 2014.

HIROMATSU, Y.; SATOH, H.; AMINO, N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook. **Hormones (Athens, Greece)**, v. 12, n. 1, p. 12–18, mar. 2013.

HIYAMA, K. et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 87, n. 4, p. 269–274, abr. 2001.

HOMONCIK, M. et al. Altered platelet plug formation in hyperthyroidism and hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 3006–3012, ago. 2007.

IKEDE, B. O.; LULE, M.; TERRY, R. J. Anaemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with *Trypanosoma congolense* or *T. brucei*. **Acta Tropica**, v. 34, n. 1, p. 53–60, mar. 1977.

INZERILLO, A. M.; ZAIDI, M.; HUANG, C. L. H. Calcitonin: the other thyroid hormone. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 12, n. 9, p. 791–798, set. 2002.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, abr. 2015.

IWATANI, Y. et al. Marked increase of CD5 + B cells in hyperthyroid Graves' disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 78, n. 2, p. 196–200, nov. 1989.

JAFARZADEH, A. et al. Immunological and hematological changes in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism. **Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale**, v. 33, n. 5, p. E271-279, 1 out. 2010.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. DAS C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 502, 6 set. 2018.

JARA, E. L. et al. Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. **Immunology Letters**, v. 184, p. 76–83, abr. 2017.

JIANG, E. et al. Essential role of CD11a in CD8+ T-cell accumulation and activation in adipose tissue. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 1, p. 34–43, jan. 2014.

JOHNSTONE, C. et al. Endocrine system: part 1. **Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain): 1987)**, v. 28, n. 38, p. 42–49, 27 maio 2014.

KAPLANSKI, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 138–153, jan. 2018.

KEATING, S. M. et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 199, p. 451–459, 15 nov. 2015.

KENT, N. L.; ATLURI, S. C.; CUFFE, J. S. M. Maternal Hypothyroidism in Rats Reduces Placental Lactogen, Lowers Insulin Levels, and Causes Glucose Intolerance. **Endocrinology**, v. 163, n. 2, p. bqab231, 1 fev. 2022.

KHAN, Y. S.; FARHANA, A. Histology, Thyroid Gland. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

KOTNER, J.; TARLETON, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 861–869, fev. 2007.

KROPF, S. P. Carlos Chagas: science, health, and national debate in Brazil. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9779, p. 1740–1741, 21 maio 2011.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 5, p. 207–216, maio 1998.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 166, n. 7, p. 4596–4603, 1 abr. 2001.

LEHTIMÄKI, S.; LAHESMAA, R. Regulatory T Cells Control Immune Responses through Their Non-Redundant Tissue Specific Features. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 294, 23 set. 2013.

LEÓN, B.; BALLESTEROS-TATO, A.; LUND, F. E. Dendritic cells and B cells: unexpected partners in Th2 development. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 193, n. 4, p. 1531–1537, 15 ago. 2014.

LEÓN, B.; LUND, F. E. IL-17-producing B cells combat parasites. **Nature Immunology**, v. 14, n. 5, p. 419–421, maio 2013.

LEPLETIER, A. et al. Early double-negative thymocyte export in *Trypanosoma cruzi* infection is restricted by sphingosine receptors and associated with human chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3203, out. 2014.

LIEKE, T. et al. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 6817–6825, dez. 2004.

LIN, H.-Y. et al. Nongenomic regulation by thyroid hormone of plasma membrane ion and small molecule pumps. **Discovery Medicine**, v. 14, n. 76, p. 199–206, set. 2012.

LING, Y.; PUEL, A. IL-17 and infections. **Actas Dermo-Sifiliograficas**, v. 105 Suppl 1, p. 34–40, out. 2014.

LIPPI, G. et al. Should women with abnormal serum thyroid stimulating hormone undergo screening for anemia? **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 132, n. 3, p. 321–322, mar. 2008.

LIPPI, G. et al. Hyperthyroidism is associated with shortened APTT and increased fibrinogen values in a general population of unselected outpatients. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 28, n. 3, p. 362–365, out. 2009.

LIU, W. K.; TSUI, K. W.; WONG, C. C. Repressed activity of peritoneal macrophages in methimazole-induced hypothyroid mice. **Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology**, v. 63, n. 2, p. 131–136, 1993.

LOMONACO, D. A. et al. Abnormal regulation of thyroid function in patients with chronic Chaga's disease. **Acta Endocrinologica**, v. 53, n. 1, p. 162–176, set. 1966.

LÓPEZ, L. et al. [C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure]. **Revista Espanola De Cardiologia**, v. 59, n. 1, p. 50–56, jan. 2006.

LUSTER, A. D.; UNKELESS, J. C.; RAVETCH, J. V. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. **Nature**, v. 315, n. 6021, p. 672–676, 20 jun. 1985.

MACHADO, F. S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 14–15, p. 1558–1566, dez. 2008.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 4, p. 661–665, 15 fev. 2013.

MAGSINO, C. H. et al. Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 6, p. 799–803, jun. 2000.

MAHONEY, M. X.; CURRIER, N. L.; MILLER, S. C. Natural killer cell levels in older adult mice are gender-dependent: thyroxin is a gender-independent natural killer cell stimulant. **Natural Immunity**, v. 16, n. 4, p. 165–174, 1998.

MANNA, D.; ROY, G.; MUGESH, G. Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 11, p. 2706–2715, 19 nov. 2013.

MARCONDES, M. C. G. et al. Acute Trypanosoma cruzi infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 4, p. 347–352, 1 abr. 2000.

MARIANI, E. et al. Vitamin D, thyroid hormones and muscle mass influence natural killer (NK) innate immunity in healthy nonagenarians and centenarians. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 116, n. 1, p. 19–27, abr. 1999.

MARINO, F. et al. Thyroid hormone regulation of cell migration and oxidative metabolism in polymorphonuclear leukocytes: clinical evidence in thyroidectomized subjects on thyroxine replacement therapy. **Life Sciences**, v. 78, n. 10, p. 1071–1077, 2 fev. 2006.

MARTINS, G. A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 13, p. 1133–1144, nov. 2004.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 221–241, 2012.

MCCOMB, S. et al. Introduction to the Immune System. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2024, p. 1–24, 2019.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J.; GAFFEN, S. L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 892–906, 16 abr. 2019.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010.

MINOPRIO, P. et al. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 151, n. 8, p. 4200–4208, 15 out. 1993.

MISHRA, J. et al. Hypothyroidism Induces Interleukin-1-Dependent Autophagy Mechanism as a Key Mediator of Hippocampal Neuronal Apoptosis and Cognitive Decline in Postnatal Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 3, p. 1196–1211, mar. 2021.

MIYAZAKI, Y. et al. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 1150–1157, 15 jul. 2010.

MOHEBATI, A.; SHAHA, A. R. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. **Clinical Anatomy (New York, N.Y.)**, v. 25, n. 1, p. 19–31, jan. 2012.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **Lancet (London, England)**, v. 389, n. 10066, p. 312–325, 21 jan. 2017.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 290–295, maio 2017.

MONSALVE-LARA, J. et al. The risk of oral transmission in an area of a Chagas disease outbreak in the Brazilian northeast evaluated through entomological, socioeconomic and schooling indicators. **Acta Tropica**, v. 215, p. 105803, mar. 2021.

MONTEIRO, F. A. et al. Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, v. 99, p. 265–344, 2018.

MOOIJ, P. et al. Effect of thyroid hormones and other iodinated compounds on the transition of monocytes into veiled/dendritic cells: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumour-necrosis factor-alpha and interleukin-6. **The Journal of Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 503–512, mar. 1994.

MOUSA, S. S. et al. Human platelet aggregation and degranulation is induced in vitro by L-thyroxine, but not by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine or diiodothyropropionic acid (DITPA). **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 16, n. 3, p. 288–293, jun. 2010.

MOYA, P.; BASSO, B.; MORETTI, E. [Congenital Chagas disease in Córdoba, Argentina: epidemiological, clinical, diagnostic, and therapeutic aspects. Experience of 30 years of follow up]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 38 Supl 2, p. 33–40, 2005.

MÜLLER, U. et al. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 167, n. 6, p. 3346–3353, 15 set. 2001.

MULLUR, R.; LIU, Y.-Y.; BRENT, G. A. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 355–382, abr. 2014.

MURPHY, M. L. et al. IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2848–2856, out. 2001.

MYLOTTE, K. M. et al. Milrinone and thyroid hormone stimulate myocardial membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and share structural homologies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 23, p. 7974–7978, dez. 1985.

NAGAI, S.; AZUMA, M. The CD28-B7 Family of Co-signaling Molecules. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1189, p. 25–51, 2019.

NANDAKUMAR, D. N. et al. Activation of NF-kappaB in lymphocytes and increase in serum immunoglobulin in hyperthyroidism: possible role of oxidative stress. **Immunobiology**, v. 213, n. 5, p. 409–415, 2008.

NIJAMPURKAR, B. et al. Anti-Inflammatory Role of Thyroid Hormones on Rat Air Pouch Model of Inflammation. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 14, n. 2, p. 117–124, 2015.

NOVAES, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p. 2873–2881, ago. 2015.

NOYA, B. A. DE et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377–386, maio 2015.

OLIVEIRA, A.-C. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 173, n. 9, p. 5688–5696, 1 nov. 2004.

ONOFRIO, L. I. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Is a Potent Risk Factor for Non-alcoholic Steatohepatitis Enhancing Local and Systemic Inflammation Associated with Strong Oxidative Stress and Metabolic Disorders. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003464, 10 fev. 2015.

ORTIGA-CARVALHO, T. M. et al. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1387–1428, 13 jun. 2016.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

ÖZGÜR, E. et al. The Effect of Congenital and Postnatal Hypothyroidism on Depression-Like Behaviors in Juvenile Rats. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology**, v. 8, n. 4, p. 439–444, 1 dez. 2016.

PANVELOSKI-COSTA, A. C. et al. Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycaemia control in alloxan-induced diabetic wistar rats. **Acta Physiologica**, v. 217, n. 2, p. 130–140, jun. 2016.

PARKER, H. A. et al. Antimicrobial Activity of Neutrophils Against Mycobacteria. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 782495, 2021.

PASCUAL, A.; ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 7, p. 3908–3916, jul. 2013.

PASSOS, L. S. A. et al. Activation of Human CD11b+ B1 B-Cells by *Trypanosoma cruzi*-Derived Proteins Is Associated With Protective Immune Response in Human Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3015, 2018.

PATIL, N.; REHMAN, A.; JIALAL, I. Hypothyroidism. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

PEIXOTO, M. S. et al. Hypothyroidism induces oxidative stress and DNA damage in breast. **Endocrine-Related Cancer**, v. 28, n. 7, p. 505–519, 20 jun. 2021.

PELUS, L. M.; FUKUDA, S. Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. **Experimental Hematology**, v. 34, n. 8, p. 1010–1020, ago. 2006.

PEREIRA, S. A. DE L. et al. O peso do baço em chagásicos crônicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 167–170, abr. 1999.

PEREIRA, S. A. DE L. et al. Morphometric study of the spleen in chronic Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 401–403, abr. 2002.

PÉREZ, A. R. et al. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 7, p. 890–900, out. 2007.

PÉREZ, A. R. et al. Immunoendocrinology of the thymus in Chagas disease. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 5, p. 328–338, 2011.

PÉREZ, A. R. et al. The Thymus in Chagas Disease: Molecular Interactions Involved in Abnormal T-Cell Migration and Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1838, 2020.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 06 2018.

PFLUGFELDER, S. C. et al. LFA-1/ICAM-1 Interaction as a Therapeutic Target in Dry Eye Disease. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 1, p. 5–12, 1 jan. 2017.

PINTO, A. Y. DAS N. et al. [Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602–614, dez. 2008.

PIRAHANCI, Y.; TARIQ, M. A.; JIALAL, I. Physiology, Thyroid. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.

PLANELLES, L. et al. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, n. 1, p. 41–47, jan. 2003.

PONTES, A. A. N. et al. Prevalência de Doenças da Tireóide em Uma Comunidade do Nordeste Brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 544–549, out. 2002.

POPOVENIUC, G. et al. Graves' disease and thymic hyperplasia: the relationship of thymic volume to thyroid function. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 20, n. 9, p. 1015–1018, set. 2010.

PRATA, A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 81–88, 1999.

PROVIDELLO, M. V. et al. Benefits of Ascorbic Acid in Association with Low-Dose Benznidazole in Treatment of Chagas Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. e00514-18, /aac/62/9/e00514-18.atom, 9 jul. 2018.

PROVINCIALI, M. et al. Recovery of spleen cell natural killer activity by thyroid hormone treatment in old mice. **Natural Immunity and Cell Growth Regulation**, v. 10, n. 4, p. 226–236, 1991.



PROVINCIALI, M.; DI STEFANO, G.; FABRIS, N. Regulation of NK cell lymphokine responsiveness by pituitary-thyroid hormones during ontogeny in mice. Suggestion for a sequential neuroendocrine-immune cross-talk. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 741, p. 73–80, 25 nov. 1994.

RAMPAZO, E. V. et al. Antigen targeting to dendritic cells allows the identification of a CD4 T-cell epitope within an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **PloS One**, v. 10, n. 2, p. e0117778, 2015.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 17 abr. 2010.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 140, n. 12, p. 4342–4347, 15 jun. 1988.

REED, S. G. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 153, n. 7, p. 3135–3140, 1 out. 1994.

REGGIANI, P. C. et al. Physiology and therapeutic potential of the thymic peptide thymulin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 29, p. 4690–4696, 2014.

RITTENHOUSE, P. A.; REDEI, E. Thyroxine administration prevents streptococcal cell wall-induced inflammatory responses. **Endocrinology**, v. 138, n. 4, p. 1434–1439, abr. 1997.

RIZZO, L. F. L. et al. [Myxedema coma]. **Medicina**, v. 77, n. 4, p. 321–328, 2017.

ROBINSON, M. V. et al. Parameters of cellular and humoral immunity in experimental hyperthyroidism and its correction. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 156, n. 4, p. 473–475, fev. 2014.

RODRIGUEZ, P.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Activation of cord blood myeloid dendritic cells by *Trypanosoma cruzi* and parasite-specific antibodies, proliferation of CD8+ T cells, and production of IFN- $\gamma$ . **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, n. 2, p. 157–169, maio 2012.

ROFFÊ, E. et al. Role of CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 8–9, p. 669–676, ago. 2010.

ROSA, L. F.; SAFI, D. A.; CURI, R. Effect of hypo- and hyperthyroidism on the function and metabolism of macrophages in rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 13, n. 2, p. 141–147, jun. 1995.

ROSS, D. S. et al. 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 26, n. 10, p. 1343–1421, out. 2016.

RUBINGH, J. et al. The Role of Thyroid Hormone in the Innate and Adaptive Immune Response during Infection. **Comprehensive Physiology**, v. 10, n. 4, p. 1277–1287, 24 set. 2020.

SAMPAIO, P. A. et al. Hypothyroidism impairs the host immune response during the acute phase of Chagas disease. **Immunobiology**, v. 225, n. 6, p. 152024, nov. 2020.

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

SANTOS, V. R. C. D. et al. Human acute Chagas disease: changes in factor VII, activated protein C and hepatic enzymes from patients of oral outbreaks in Pará State (Brazilian Amazon). **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e190364, 2020.

SARATI, L. I. et al. Hypothyroidism: age-related influence on cardiovascular nitric oxide system in rats. **Metabolism**, v. 61, n. 9, p. 1301–1311, set. 2012.

SCHOFIELD, C. J. *Trypanosoma cruzi* -- the vector-parasite paradox. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 535–544, ago. 2000.

SHARMA, S. D.; TSAI, V.; PROFFITT, M. R. Enhancement of mouse natural killer cell activity by thyroxine. **Cellular Immunology**, v. 73, n. 1, p. 83–97, out. 1982.

SHIELDS, B. M. et al. Fetal Thyroid Hormone Level at Birth Is Associated with Fetal Growth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 6, p. E934–E938, jun. 2011.

SICHERI, R. et al. Low prevalence of hypothyroidism among black and Mulatto people in a population-based study of Brazilian women. **Clinical Endocrinology**, v. 66, n. 6, p. 803–807, jun. 2007.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 8, p. s314-325, 1 maio 2003.

SILVA PEREIRA, S. et al. Tissue tropism in parasitic diseases. **Open Biology**, v. 9, n. 5, p. 190036, 31 maio 2019.

SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012.

SINGH, G.; CORREA, R. Methimazole. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139–144, set. 2015.

STEIN-STREILEIN, J. et al. Hyperthyroxinemic mice have reduced natural killer cell activity. Evidence for a defective trigger mechanism. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 139, n. 7, p. 2502–2507, 1 out. 1987.

STUIJVER, D. J. F. et al. The effect of hyperthyroidism on procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors: a systematic review and meta-analysis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 108, n. 6, p. 1077–1088, dez. 2012.

SULLIVAN, N. L. et al. Deficiency of antigen-specific B cells results in decreased Trypanosoma cruzi systemic but not mucosal immunity due to CD8 T cell exhaustion. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 194, n. 4, p. 1806–1818, 15 fev. 2015.

SULLIVAN, S. A. Hypothyroidism in Pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 62, n. 2, p. 308–319, 2019.

SZABÓ, J. et al. Parameters of respiratory burst and arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear granulocytes from patients with various thyroid diseases. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 104, n. 2, p. 172–176, 1996.

TABACHNIK, T. et al. Thyroid Hormone-Dependent Epigenetic Regulation of Melanocortin 4 Receptor Levels in Female Offspring of Obese Rats. **Endocrinology**, v. 158, n. 4, p. 842–851, 1 abr. 2017.

TALAMONTI, M. et al. Efalizumab. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 10, n. 2, p. 239–251, mar. 2011.

TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 144, n. 2, p. 717–724, 15 jan. 1990.

TARLETON, R. L. et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 5, p. 1820–1829, maio 1994.

TAYLOR, P. N. et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 301–316, 23 mar. 2018.

THAPA, P.; FARBER, D. L. The Role of the Thymus in the Immune Response. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 29, n. 2, p. 123–131, maio 2019.

TORRICO, F. et al. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 146, n. 10, p. 3626–3632, 15 maio 1991.

TOSELLO BOARI, J. et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002658, 2012.

UNNIKRISHNAN, A. G. et al. Prevalence of hypothyroidism in adults: An epidemiological study in eight cities of India. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 647–652, jul. 2013.

VAN DER SPEK, A. H. et al. Regulation of Intracellular Triiodothyronine Is Essential for Optimal Macrophage Function. **Endocrinology**, v. 159, n. 5, p. 2241–2252, 1 maio 2018.

VANDERPUMP, M. P. J. The epidemiology of thyroid disease. **British Medical Bulletin**, v. 99, p. 39–51, 2011.

VAREDI, M. et al. Effects of hypo- and hyperthyroid states on herpes simplex virus infectivity in the rat. **Endocrine Research**, v. 39, n. 2, p. 51–56, maio 2014.

WATANABE COSTA, R.; DA SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. Interactions between Trypanosoma cruzi Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 388, 2016.

WENSVEEN, F. M. et al. “Beauty and the beast” in infection: How immune-endocrine interactions regulate systemic metabolism in the context of infection. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 7, p. 982–995, jul. 2019.

WOLPE, S. D. et al. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 2, p. 612–616, jan. 1989.

YANG, Y. et al. Maternal Thyroid Dysfunction and Gestational Anemia Risk: Meta-Analysis and New Data. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 201, 2020.

ZHANG, Y.; GARCIA-IBANEZ, L.; TOELLNER, K.-M. Regulation of germinal center B-cell differentiation. **Immunological Reviews**, v. 270, n. 1, p. 8–19, 2016.

ZHOU, X.-L. et al. Different Doses and Routes of Administration of Methimazole Affect Thyroid Status in Methimazole-induced Hypothyroidism in Rats. **The West Indian Medical Journal**, v. 65, n. 1, p. 93–97, 7 maio 2015a.

ZHOU, X.-L. et al. Different Doses and Routes of Administration of Methimazole Affect Thyroid Status in Methimazole-Induced Hypothyroidism in Rats. **West Indian Medical Journal**, 21 maio 2015b.

ZIMMERMANN, M. B.; ANDERSSON, M. GLOBAL ENDOCRINOLOGY: Global perspectives in endocrinology: coverage of iodized salt programs and iodine status in 2020. **European Journal of Endocrinology**, v. 185, n. 1, p. R13–R21, 10 jun. 2021.

***ANEXOS***



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

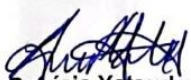
## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Consequências do hipotireoidismo na doença de Chagas experimental", registrada sob nº 19.1.149.60.8, sob a responsabilidade de Pedro Alexandre Sampaio Oliveira e José Clóvis do Prado Junior, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião do dia 25/04/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

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

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	03/05/2019 a 02/12/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Rato heterogênico Wistar Hannover
Nº de animais	72
Peso/Idade	120 a 140 g/ 5 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério de Criação/ Manutenção da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 03 de maio de 2019.

  
**Ana Patricia Yatsuda Natsui**  
 Coordenadora da CEUA-FCFRP

