

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Grelina: possíveis efeitos cardioprotetores e imunomoduladores na
doença de Chagas experimental aguda**

Ferdinando de Paula Silva

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Grelina: possíveis efeitos cardioprotetores e imunomoduladores na
doença de Chagas experimental aguda**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Ferdinando de Paula Silva

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 28/04/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

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.

Silva, Ferdinando de Paula

Grelina: possíveis efeitos cardioprotetores e imunomoduladores na doença de Chagas experimental aguda, Ribeirão Preto, 2017.

89f. Il. ; 30cm.

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

Orientadora: Carraro Abrahão, Ana Amélia

1. Grelina. 2. Doença de Chagas. 3. Imunomodulação. 4. *Trypanosoma cruzi*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferdinando de Paula Silva

Grelina: possíveis efeitos cardioprotetores e imunomoduladores na doença de Chagas experimental aguda.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Aos meus pais **Maria Cecília de Paula Silva** e **Sebastião Teodoro da Silva Filho**, que através de conselhos, amor, carinho e respeito, sempre me apoiaram nessa trajetória acadêmica... e na vida. São os meus eternos exemplos”.

“Aos meus irmãos **Aparecido**, **Luiz**, **Denílson** e **Lenilson**, que me deram forças para continuar os estudos”.

“À **Juliana Honório**, minha namorada, amiga, companheira, que sempre me acompanhou e ajudou em todos os momentos. Meu eterno obrigado, amor. Eu amo você!”

“À minha **família** por inteiro”.

“À **Deus**, que fez tornar tudo possível”.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

“À **Professora Doutora Ana Amélia Carraro Abrahão**, por toda atenção, ajuda, carinho, conhecimentos e amizade. Não tenho palavras para descrever esse momento... Enfim, muito obrigado pela dedicação, sabedoria e pelo exemplo de vida”.

“À **Cássia Mariana Bronzon da Costa**, colega de doutorado, que sempre me ajudou nas dúvidas, questionamentos e na realização dos experimentos laboratoriais. Obrigado por todo apoio e ensinamento”.

“À **Diego Fernando Silva Lessa**, colega de doutorado, que me ajudou na realização dos exames eletrocardiográficos e dos ensinamentos repassados, sempre com muita alegria e descontração”.

“Ao colega de pós-doutorado, **Luiz Miguel Pereira**, obrigado por todo conhecimento transmitido”.

“Aos meus colegas de laboratório: **Júnior Furini, Gisele Bulhões Portapilla, Zumira Aparecida Carneiro, Maiara Providello, Rafaela Pravato Colato e Bianca Kanebako**”.

“Aos funcionários do laboratório de Parasitologia, **Cristiana Gonzalez Rotta e Georgius Luiz de Oliveira**, que são fundamentais no desenvolvimento científico-tecnológico do laboratório de Parasitologia da FCFRP-USP”.

“À **Miriam Paula Alonso Toldo**, obrigado pelos ensinamentos repassados”.

“À **Fabiana Rossetto de Moraes**, profissional responsável pelo laboratório de citometria de fluxo da FCFRP-USP”.

“Aos profissionais, **Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa e Dr. Dimitrius Leonardo Pitol** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), pelo auxílio na confecção dos cortes histológicos”.

“À **Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza**, pela disponibilização do aparelho sonicador durante a execução da pesquisa”.

“À todos aqueles que pude fazer amizade durante esse tempo de mestrado: **Professores, alunos de graduação, iniciação científica e colegas de pós-graduação**”.

“À **Vânia Cláudia de Albuquerque**, pelo auxílio na escrita do resumo em espanhol”.

“À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (**FCFRP-USP**), em especial ao programa de Biociências Aplicadas à Farmácia”.

“À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pelo auxílio financeiro concedido à bolsa de mestrado”.

“À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo auxílio financeiro concedido para realização da pesquisa (Processo nº 2014/18682-3)”.

“Buscar as coisas do Alto. Não podemos ter medo de sonhar com grandes ideais. Triste de quem se acomoda e se apequena com reduzidos propósitos. A vida é feita de grandes projetos. O ser humano é chamado para grandes ideais. Os grandes sonhos nos dão força para superarmos os pequenos e grandes obstáculos”.

Pe. Léo

RESUMO

SILVA, F. P. **Grelina: possíveis efeitos cardioprotetores e imunomoduladores na doença de Chagas experimental aguda**. 2017. 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A doença de Chagas, causada por um protozoário flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, acomete milhares de pessoas ao redor do mundo. O tratamento continua parcialmente ineficaz, envolvendo terapias específicas dirigidas ao parasita assim como terapias adjuvantes em conduta para as manifestações clínicas. No Brasil, o benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) vem sendo o único medicamento disponível para o tratamento etiológico da doença, porém pode causar efeitos colaterais aos pacientes infectados. Há emergente necessidade de avaliar o potencial de novas drogas para modular o sistema imune em resposta a agressão parasitária. A grelina tem demonstrado, em estudos recentes, ser uma importante substância com função cardioprotetora, vasodilatadora, anti-apoptótica e anti-oxidativa. No entanto, pouco se sabe da ação imunomoduladora da grelina na doença de Chagas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos cardioprotetores e imunomoduladores da grelina em ratos Wistar machos infectados pela cepa Y de *T. cruzi*. Foram analisados os seguintes parâmetros: quantificação dos parasitas sanguíneos e teciduais, análise de marcadores celulares (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK, NKT, CD45RA⁺, macrophage e RT1B⁺) e produção de óxido nítrico. Além disso, outros parâmetros foram analisados, entre eles, os ensaios de linfoproliferação, apoptose de esplenócitos e avaliação de registros eletrocardiográficos. A grelina por si só não ocasionou uma diminuição da parasitemia sanguínea, tecidual ou na quantificação de óxido nítrico, porém exerceu com maestria sua ação anti-apoptótica e antiinflamatória conferindo redução do processo inflamatório cardíaco e da destruição tecidual. A associação com benzonidazol não proporcionou uma potencialização da resposta imune.

Palavras-chave: Grelina, Doença de Chagas, Imunomodulação, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

SILVA, F. P. **Ghrelin: possible cardioprotective and immunomodulatory effects in acute experimental phase of Chaga's disease.** 2017. 89f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Chaga's disease, caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects thousands of people around the world. The treatment remains partially ineffective, involving targeted therapies directed to the parasite as well as adjuvant therapies for the clinical manifestations. In Brazil, the benznidazole (N-benzyl-2-nitroimidazol-1-acetamide) is the only drug available for the etiological treatment of the disease, with several side effects. There is an emerging need to evaluate potential new drugs to modulate the immune system against the parasitic aggression. Ghrelin a peptide hormone has been pointed as a substance with important cardioprotective, vasodilatory, anti-apoptotic and anti-oxidative functions. The lack of literature concerning to the immunomodulatory action of ghrelin in Chagas' disease, turns this work inedit. For that, the objectives of this study was to evaluate the cardioprotective and immunomodulatory effects of ghrelin in male Wistar rats infected with the Y strain of *T. cruzi*. The following parameters were analyzed: quantification of blood and tissue parasites, analysis of cell markers (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK, NKT, CD45RA⁺, macrophage and RT1B⁺), nitric oxide production, lymphoproliferation assays, splenocyte apoptosis and evaluation electrocardiographic records. Ghrelin alone did not exert any action in reducing blood or tissue parasitemia, as well as the nitric oxide quantification, but it exerted with mastery its anti-apoptotic and anti-inflammatory actions triggering a reduction of the cardiac inflammatory process and tissue destruction. The combination with benznidazole did not provide a synergic action of the immune response.

Key words: Ghrelin, Chagas disease, Immunomodulation, *Trypanosoma cruzi*

RESUMEN

SILVA, F. P. **Ghrelina: los posibles efectos cardioprotectores e inmunomoduladores en la enfermedad de Chagas experimental aguda.** 2017. 89f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, afecta millares de personas alrededor del mundo. El tratamiento continúa parcialmente ineficaz envolviendo terapias específicas dirigidas al parásito así como terapias adyuvantes en conducta para las manifestaciones clínicas. En Brasil, el benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) es el único medicamento disponible para el tratamiento etiológico de la enfermedad, pero puede causar efectos colaterales a los pacientes infectados. Hay una necesidad emergente de evaluarse el potencial de nuevos medicamentos para modular el sistema inmune en respuesta a la agresión parasitaria. En estudios recientes la ghrelina ha demostrado ser una importante sustancia con funciones cardioprotectora, vasodilatadora, antiapoptótica y anti-oxidativa. Poco se sabe sobre la acción inmunomoduladora de la ghrelina en la enfermedad de Chagas. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos cardioprotectores e inmunomoduladores de la ghrelina en ratas Wistar machos infectados por la cepa Y de *T. cruzi*. Fueron evaluados los siguientes parámetros: cuantificación de los parásitos sanguíneos y tisulares, análisis de marcadores celulares (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK, NKT, CD45RA⁺, macrophage y RT1B⁺) y producción de óxido nítrico. Además, otros parámetros fueron analizados, entre ellos, los ensayos de linfoproliferación, apoptosis de esplenocitos y evaluación de registros electrocardiográficos. La ghrelina no ocasionó una disminución de la parasitemia sanguínea tisular o en la cuantificación de óxido nítrico, pero ejerció efectivamente su acción antiapoptótica y anti-inflamatoria confirmando reducción del proceso inflamatorio cardíaco y de la destrucción tisular. La asociación con el benznidazol no proporcionó una potencialización de la respuesta inmune.

Palabras Llave: Ghrelina, Enfermedad de Chagas, Inmunomodulación, *Trypanosoma cruzi*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença tropical negligenciada causada por um protozoário hemoflagelado, denominado *Trypanosoma cruzi*. Esta doença foi inicialmente descrita em 1909 no município de Lassance-MG, por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, médico sanitário e chefe do Serviço de Saúde Pública do combate à Malária. Carlos Chagas, além de identificar as formas flageladas do agente etiológico, os vetores e reservatórios, determinou todos os aspectos da doença, incluindo os mecanismos de infecção, o ciclo evolutivo, patogenia e a sintomatologia (STEVERDING, 2014).

A doença é considerada uma das mais importantes doenças parasitárias da América Latina, com relevante impacto socioeconômico (BONNEY, 2014). Estima-se que há cerca de 6 a 8 milhões de indivíduos infectados a partir do México através das Américas do Sul e Central, com 65 milhões mantendo-se em risco de infecção (DINIZ *et al.*, 2013; WHO, 2016).

As manifestações clínicas e características epidemiológicas são diferentes nas diversas áreas endêmicas (MAYA *et al.*, 2010). A migração das populações permitiu a distribuição da doença para países desenvolvidos e não endêmicos, como Austrália, Canadá, Estados Unidos, Japão e Europa (COURA & VIÑAS, 2010). Assim, a globalização da doença de Chagas aponta novos desafios e a busca de novas terapias e medicamentos que possam modular o sistema imune frente à agressão parasitária (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

A infecção em seres humanos ou outros vertebrados ocorre principalmente pelo contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos triatomíneos infectados com *T. cruzi*, que são vetores hematófagos, popularmente conhecidos por “barbeiro” da família *Reduviidae* (BIOLO *et al.*, 2010). Este mecanismo de transmissão vetorial apresenta maior importância epidemiológica, sendo as principais espécies de triatomíneos conhecidos: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *T. brasiliensis* (PINAZO & GASCON, 2015). Outros métodos de infecção incluem: transfusão

sanguínea, transmissão congênita, acidentes de laboratório, ingestão de bebidas e alimentos contaminados (COURA, 2015).

T. cruzi é um parasita intracelular obrigatório que não apresenta determinada população homogênea, sendo então, constituído por diversas cepas (WALKER *et al.*, 2014). O parasita pertence à ordem Kinetoplastida, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Schizotrypanum*. Estrutura peculiar da ordem Kinetoplastida, o cinetoplasto contém elevada concentração de DNA (ácido desoxirribonucleico) extranuclear do parasito, conhecido como k-DNA. O cinetoplasto é responsável por codificar enzimas de cadeia respiratória, dentre outras funções bioquímicas essenciais para o metabolismo do protozoário (TEIXEIRA *et al.*, 2011). *T. cruzi* possui distinta morfologia, infectividade, virulência e patogenicidade, sendo o ciclo de vida bem complexo, que envolve o hospedeiro mamífero e o inseto vetor (DE SOUZA *et al.*, 2010). Este protozoário possui quatro estágios evolutivos: tripomastigota sanguícola, amastigota, epimastigota e tripomastigota metacíclico.

Conforme o ciclo natural e evolutivo deste protozoário, o inseto vetor ingere as formas tripomastigotas sanguícolas do hospedeiro mamífero, seguido por transformação em formas epimastigotas que sofrem divisão binária no intestino do inseto. Aproximadamente, três a quatro semanas, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, estágio conhecido como metaciclogênese (VIDAL *et al.*, 2016). Estas formas metacíclicas do parasita são infectantes para o hospedeiro mamífero, que migram para a porção posterior (ampola retal) do intestino do inseto.

A transmissão para um novo hospedeiro mamífero ocorre através das fezes ou urina do inseto contendo o protozoário, durante ou logo após o repasto sanguíneo. O protozoário penetra pela solução de continuidade da pele ou através de superfícies membranosas, tais como mucosa nasal, oral ou conjuntiva (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Em seguida, os tripomastigotas metacíclicos invadem células do sistema fagocitário mononuclear e fibroblastos, e no citoplasma celular, transformam-se na forma amastigota. Tais formas sofrerão uma série de divisões celulares sucessivas que romperão as células parasitadas, e posteriormente, liberarão os tripomastigotas na circulação sanguínea, reiniciando assim o ciclo (CARREA & DIAMBRA, 2016). Embora *T. cruzi* se multiplique em muitos tipos

celulares, o parasita apresenta um tropismo para células da musculatura lisa, esquelética e cardíaca (EPTING *et al.*, 2010).

Conforme descrito anteriormente, na interação entre o parasita e o hospedeiro, o tripomastigota metacíclico invade inúmeras células nucleadas como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Este processo de interação está dividido em três fases: 1) Adesão e reconhecimento; 2) Sinalização; e 3) Invasão (DE SOUZA *et al.*, 2010). Diferentes cepas e formas evolutivas de *T. cruzi* expressam distintas moléculas em suas superfícies. O protozoário depende de um arsenal de moléculas glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) ligados a proteínas de superfície, como mucinas, trans-sialidases e também outras moléculas com propriedades de invasão a células do hospedeiro para a formação do vacúolo parasitóforo (CARDOSO *et al.*, 2015).

As mucinas são glicoproteínas de superfície de maior quantidade no *T. cruzi* e seus resíduos de açúcares interagem com células do hospedeiro, implicando sua importância na infecção (DE SOUZA *et al.*, 2010). As trans-sialidases também são glicoproteínas com grande fator de virulência, pertencentes ao grupo das GPI mucinas responsáveis por mediar a interação do parasita com as células do hospedeiro (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2015).

As glicoproteínas de superfície com propriedades de adesão em tripomastigotas metacíclicos, tais como gp82, gp30 e gp90 são diferentemente expressas em várias cepas, ligando-se a célula-alvo com o objetivo de internalização (MAEDA *et al.*, 2012). A gp82 faz parte de uma família multigênica pertencente ao grupo trans-sialidade/gp85, sendo envolvida pela alta infectividade de *T. cruzi* ao hospedeiro. Esta glicoproteína possui a capacidade de desencadear a cascata de sinalização celular resultando na mobilização das concentrações citosólicas de cálcio (Ca^{2+}), considerado um evento essencial para o processo de internalização (RUIZ *et al.*, 1998). A gp90 apresenta propriedade oposta da gp82 na infectividade do parasita, pois devido a sua alta expressão e por falta da mobilização de Ca^{2+} , ocorre menor interação a célula-alvo (YOSHIDA, 2006). Esta molécula parece ter atividade semelhante a glicosidase e sua atividade antifagocitária é regulada pela remoção de resíduos de açúcar, sendo outros mecanismos necessários para a internalização do parasita (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Porém, *T. cruzi* também pode invadir células não fagocíticas por dois modos: a) via lisossomo-dependente, o qual induz a sinalização de Ca^{2+} por geração de inositol-trifosfato (IP3); e b) via invaginação da membrana plasmática, seguido da fusão intracelular com lisossomos (ANDRADE & ANDREWS, 2004; CARDOSO *et al.*, 2015).

1.2 Manifestações clínicas da doença e diagnóstico

Clinicamente, a doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. Independente do mecanismo de transmissão, geralmente a fase aguda é assintomática, e inicia-se imediatamente após a infecção (RASSI & MARIN-NETO, 2010; CHATELAIN, 2015). A fase aguda apresenta um conjunto de manifestações, variáveis em frequência e intensidade. As condições gerais que podem ser representadas nesta fase são: febre, edema generalizado, hepatomegalia, esplenomegalia, dores musculares e, algumas vezes, insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas (RASSI & MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Em raros casos, a doença apresenta manifestações locais com intensa reação inflamatória, quando *T. cruzi* penetra na conjuntiva ou na pele, sendo conhecidos respectivamente como sinal de Romaña (edema bupalpebral e unilateral) e chagoma de inoculação, no caso de transmissão vetorial (WHO, 2016). As lesões aparecem em 50% dos casos agudos no período de 4 a 10 dias após a picada do inseto vetor, regredindo em um ou dois meses (BIOLO *et al.*, 2010). A taxa de mortalidade de pacientes agudamente infectados, frequentemente crianças, é menor que 2%, sendo a miocardite e meningoencefalite as condições mais comuns de morte (HEMMIGE *et al.*, 2012).

Os estudos histopatológicos da doença de Chagas associados à fase aguda demonstram intenso parasitismo associado com inflamação difusa (BOTONI *et al.*, 2013). De fato, o coração pode ser lesado intensamente devido ao parasitismo e presença de ninhos de amastigotas, sendo que a miocardite aguda depende do grau de acometimento do coração e da infecção sistêmica.

Os indivíduos que sobrevivem à fase aguda, a resposta imune celular controla a multiplicação do parasita, os sintomas desaparecem espontaneamente, e

a parasitemia patente desaparece em 4 a 8 semanas (RASSI & MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Eventualmente, o parasita e o hospedeiro não atingem um equilíbrio imunológico cursando a doença para a fase crônica. Aproximadamente um terço dos indivíduos infectados evolui para esta fase (STEVERDING, 2014). Neste período, ocorre diminuição da parasitemia e os pacientes tornam-se assintomáticos (STEVERDING, 2014). Os indivíduos chagásicos, após permanecerem assintomáticos por vários anos, poderão desenvolver sintomatologia grave associada ao sistema cardiovascular e insuficiência cardíaca congestiva levando-o a morte e/ou desenvolvimento de desordens gastrointestinais, tais como, o megacólon e megaesôfago (BONNEY, 2014). A forma cardíaca crônica é a mais importante e significativa manifestação clínica da doença, sendo que os sinais e sintomas da cardiomiopatia chagásica crônica são devido a arritmias, insuficiência cardíaca, bloqueios atrioventriculares e de ramo e tromboembolismo (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010).

O diagnóstico da fase aguda é feito através de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa para observação das formas tripomastigotas no sangue ou em raros casos, no fluido cérebro-espinhal (HEMMIGE *et al.*, 2012). Este método diagnóstico oferece vantagem por permitir observar com detalhes a morfologia do parasita, sendo realizado em situações de alta parasitemia. A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) também pode ser utilizada para o diagnóstico da infecção chagásica aguda e infecção congênita (ZULANTAY *et al.*, 2007).

Na fase crônica o método diagnóstico pode ser feito através da detecção de anticorpos específicos IgG para *T. cruzi*, sendo as técnicas de ELISA, imunofluorescência indireta (IFAT) e hemaglutinação indireta, as mais utilizadas nessa fase (GOMES *et al.*, 2009). Contudo, o diagnóstico sorológico para doença de Chagas em ambas as fases, segue a realização de dois testes sorológicos diferentes. Ao persistirem resultados duvidosos, devem-se empregar outras técnicas e repetir as reações (WHO, 2016).

O eletrocardiograma é um bom método diagnóstico por mostrar alterações peculiares da cardiopatia chagásica. As alterações mais frequentes na fase aguda são comuns a qualquer miocardite, incluindo: taquicardia sinusal, complexos ventriculares prematuros, baixa voltagem dos complexos QRS,

prolongamento do intervalo PR (bloqueio atrioventricular de primeiro grau) e/ou QT, alteração da repolarização ventricular e alterações da onda P (GONZALEZ *et al.*, 2009; MAYA *et al.*, 2010). No entanto, as arritmias ventriculares, fibrilação atrial e bloqueio do ramo direito são situações de pior prognóstico (PRATA, 2001). Dentre as arritmias ventriculares, a presença de extrassístoles ventriculares é pouco comum, mas são causas frequentes de palpitações, síncope e morte súbita (RASSI *et al.*, 2006).

1.3 Tratamento

O tratamento para doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, envolvendo terapias específicas dirigidas ao parasita e terapias adjuvantes em conduta para as manifestações clínicas (BERN, 2011). O benzonidazol (BNZ) (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) e o nifurtimox (NF) são medicamentos nitroheterocíclicos utilizados no tratamento etiológico da doença. O BNZ, descrito no final da década de 1960 e início de 1970, é o único medicamento disponível no Brasil para o tratamento (MECCA *et al.*, 2008). De acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), o tratamento antitripanossomal é recomendado quando a infecção é diagnosticada por métodos sorológicos e/ou parasitológicos, na ausência de contraindicação.

Porém, ambos os medicamentos podem causar efeitos adversos ao paciente chagásico. O NF pode apresentar os seguintes efeitos: anorexia, manifestações digestivas (náuseas e vômitos) e ocasionalmente diarreia e cólicas intestinais. O BNZ pode causar reações na pele (hipersensibilidade, dermatite e erupção cutânea), edema, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares, depressão da medula óssea e púrpura trombocitopênica (CASTRO *et al.*, 2006; MUÑOZ *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação tripanocida do BNZ gera metabólitos ativos nitrorreduzidos, principalmente pela citocromo P450 redutase, xantina oxidoreductase e aldeído-oxidase (CASTRO *et al.*, 2006), os quais são capazes de se ligar covalentemente a lipídeos e proteínas do parasita; então, o fármaco inibe esta síntese de proteínas, originando a degradação na biossíntese de macromoléculas (APT, 2010).

O BNZ é indicado especialmente em casos agudos da doença que tenham ocorrido infecção por transmissão natural, transfusão sanguínea ou acidental e doença imunossupressora, com o objetivo de diminuir ou eliminar a infecção em fase aguda ou infecção recente (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Há um consenso que todos os pacientes que manifestam a forma aguda da doença devem receber tratamento, exceto gestantes, devido ao potencial teratogênico do medicamento empregado. Em casos crônicos, mesmo com a baixa eficácia do medicamento, aconselha-se o seu emprego, principalmente em crianças ou indivíduos com manifestação das formas cardíaca ou digestiva leve. Mesmo nestas situações, há ponderações e em alguns momentos, motivo de dissenso entre os especialistas e pesquisadores ao grau de recomendação do mesmo (ANDRADE *et al.*, 2011).

Além dos mecanismos tóxicos gerados pelo BNZ e NF, pacientes adultos necessitam de administração prolongada do medicamento (BERMUDEZ *et al.*, 2016). Assim, há necessidade emergente de buscar novas estratégias terapêuticas para amenizar os efeitos adversos causados por estes medicamentos, seja de modo não associado ou em combinação com outros fármacos.

1.4 Resposta imune na doença de Chagas

Sabe-se que o sistema imune inato pode detectar e responder a vários microrganismos através de estruturas conservadas tais como receptores de reconhecimento padrão (*PRRs*) e seus respectivos padrões moleculares associados a patógenos (*PAMP*) (KUMAR *et al.*, 2011). Os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* ou *TLRs*) são uma família de proteínas transmembranas expressas em diferentes células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, células T específicas, fibroblastos e células endoteliais. Portanto, os *TLRs* estão envolvidos no reconhecimento de *PAMPs* em *T. cruzi* (DOS-SANTOS *et al.*, 2016).

A importância dos *TLRs* durante a resposta imune a *T. cruzi* foi inicialmente relatada em estudos com células apresentadoras de antígenos

profissionais. Então, os pesquisadores determinaram a importância do TLR2 no mecanismo de defesa nos estágios iniciais da infecção (PELLEGRINI *et al.*, 2011).

O mecanismo desta resposta imune contra o parasita se mostra complexo, envolvendo uma variedade de populações celulares. Geralmente, a imunidade inata mediada por macrófagos e células dendríticas, são responsáveis pelo reconhecimento e destruição do parasita, apresentação de antígenos e produção de citocinas inflamatórias (TARLETON, 2007; BASSO, 2013). Contudo, o controle da infecção depende da interação entre as respostas imunes, inata e adaptativa, com a participação de macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), linfócitos T e B e a produção de citocinas pró-inflamatórias de células T helper-1 (Th1), tais como, interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12) (MACHADO *et al.*, 2012).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (APCs) derivadas da medula óssea responsáveis por reconhecer e internalizar antígenos nos sítios da infecção (COLLIN *et al.*, 2013). Na infecção chagásica, estas células formam uma associação entre as respostas imune inata e adaptativa, por capturar, processar e expressar antígenos na superfície da membrana celular (GIL-JARAMILLO *et al.*, 2016). As células dendríticas apresentam antígenos para linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e MHC classe II, respectivamente (BLUM *et al.*, 2013).

Os linfócitos T CD4⁺ auxiliam nos mecanismos efetores em macrófagos e na ativação de linfócitos TCD8⁺ (TEIXEIRA *et al.*, 2011). No instante do reconhecimento do antígeno, os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em subpopulações Th1 ou T helper-2 (Th2), conforme o padrão de citocina produzido (VIVEROS-PAREDES *et al.*, 2006). O mecanismo de diferenciação do padrão Th1 é induzido principalmente por IL-12 e IFN- γ e ocorrem em resposta aos microrganismos, tais como *T. cruzi*, que ativam as células dendríticas, macrófagos e células NK.

As células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto as células Th2 estão envolvidas na resposta controlada por anticorpos (CARDILLO *et al.*, 2007). Então, um equilíbrio imunológico se faz necessário entre as respostas imunes mediadas por estas células, promovendo um mecanismo protetor ao hospedeiro (BASSO, 2013).

No início da infecção chagásica, o mecanismo imune predominante é pró-inflamatória (Th1). A fase aguda representa a primeira resposta entre o parasita e o hospedeiro, ou seja, há formação de uma robusta resposta imune, levando ao controle da parasitemia (ANDRADE *et al.*, 2014).

A invasão de diversas células do sistema imunológico do hospedeiro por *T. cruzi*, em especial de macrófagos, inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata. Através desta interação, os macrófagos liberam IL-12 que, atua em células NK promovendo a produção de IFN- γ (CARDOSO *et al.*, 2015). As células NK constituem um subconjunto específico de linfócitos que diferencia de um progenitor hematopoiético comum aos linfócitos T (ZUCCHINI *et al.*, 2008). Estas células apresentam ampla distribuição tecidual, como por exemplo, no pulmão, fígado e baço, auxiliando no reconhecimento de vários microrganismos (FANG *et al.*, 2010).

As células NKT representam uma pequena população de linfócitos T que também agem contra uma variedade de infecções, incluindo a doença de Chagas, sendo componentes importantes tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (DUTHIE *et al.*, 2005). Estas células reconhecem antígenos lipídicos que estão em associação a moléculas similares de MHC classe I, conhecidas como CD1d (VAN KAER, 2007). Funcionalmente, as células NKT são autorreativas e produzem citocinas de padrão Th1 e Th2, incluindo a interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e IFN- γ (SEINO & TANIGUCHI, 2005).

A citocina IL-12 age reciprocamente na ativação de macrófagos, assim, mobilizando a atividade microbida através da produção de óxido nítrico (KAYAMA & TAKEDA, 2010). Esta citocina também promove a interação entre a imunidade inata e adquirida, sendo essencial na diferenciação de células T CD4⁺ naive em células efectoras Th1 (DOSREIS & LOPES, 2009). Contudo, a citocina TNF- α , também produzida por macrófagos, participa de maneira sinérgica tanto com IL-12, quanto IFN- γ (DUTRA *et al.*, 2014).

As citocinas, fator transformador de crescimento beta (TGF- β) e IL-10, também denominadas “citocinas reguladoras”, possuem ações importantes no controle da infecção chagásica. Estas citocinas antagonizam os efeitos pró-inflamatórios e tóxicos gerados pela produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ , quanto à diferenciação de células Th1 (DOSREIS & LOPES, 2009). Na fase crônica

assintomática, há predominante produção de IL-10 sobre as citocinas IFN γ e TNF α . Assim, é possível que a capacidade de produção de IL-10 na fase aguda tardia da doença, será importante para controlar a resposta e cronificação (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2008).

Os linfócitos TCD8⁺ são células importantes na redução da carga parasitária observada em tecidos infectados com *T. cruzi*, agindo de modo citotóxico em células contendo formas amastigotas (BASSO, 2013). Estes linfócitos também produzem IFN- γ , que por sua vez promove mecanismos efetores em macrófagos eliminando os parasitas fagocitados (JUNQUEIRA *et al.*, 2010). A subsequente inibição destas células resulta em descontrole da carga parasitária e exacerbação da infecção em hospedeiros infectados de forma crônica (TARLETON, 2015).

1.4.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de meia-vida curta (aproximadamente 7 segundos) gerado da oxidação do aminoácido L-arginina por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintase (NOS) (SOUFLI *et al.*, 2016). Três formas distintas de NOS são conhecidas: duas isoformas expressas constitutivamente em neurônios (nNOS/NOS1) e tecidos endoteliais (eNOS/NOS3), assim como, uma isoforma indutível (iNOS/NOS2) expressa primariamente em células do sistema imune (CARVALHO *et al.*, 2012).

O NO controla muitas funções no organismo, como por exemplo, na neurotransmissão, tônus vascular e regulação de transcrição de genes. Para promover atividade biológica, esta molécula é produzida por muitos tipos celulares, incluindo mastócitos, células dendríticas, células NK, e células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer e células da micróglia) (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012) em resposta a amplo espectro de organismos unicelulares, tais como bactérias, fungos e protozoários (NAHREVANIAN, 2009).

Durante a infecção chagásica, o NO pode modular diretamente ou indiretamente alguns mecanismos efetores mediados por leucócitos, através de ações microbicidas derivados de radicais livres tóxicos, como exemplos: o ânion superóxido (O₂⁻) e peroxinitrito (ONOO⁻) (GUTIERREZ *et al.*, 2009). Então, esta molécula exerce uma função citotóxica à *T. cruzi*, afetando fatores de crescimento

essenciais ao parasita, como por exemplo, a redução da disponibilidade do íon ferro através da nitrosilação do grupo heme (BASSO, 2013).

Dentre outros mecanismos, o NO pode afetar a sobrevivência de *T. cruzi* em macrófagos por modificar quimicamente determinadas proteínas, incluindo a família de cisteína-proteases. Contudo, este efeito inibe a atividade catalítica da cruzipaina, uma cisteína protease essencial no metabolismo deste protozoário (CARDOSO *et al.*, 2015). A citocina IFN- γ produzida por macrófagos, induz a expressão de iNOS. Então, na infecção chagásica, a ação de mediadores como, IFN- γ , IL-12 e NO são muito importantes em inibir a multiplicação do parasita (KAYAMA & TAKEDA, 2010).

Assim, nos estágios iniciais da infecção chagásica, o NO está envolvido na resposta do hospedeiro, entretanto, seu acúmulo pode causar lesões teciduais (TATAKIHARA *et al.*, 2015; SOUFLI *et al.*, 2016).

1.5 Grelina

A grelina é um hormônio peptídico gástrico constituído de 28 aminoácidos identificado e isolado por Kojima *et al.* (1999) através de extratos do estômago de rato. A grelina humana apresenta grande homologia com a grelina de rato, diferindo apenas em dois aminoácidos nos resíduos 11 e 12 da molécula, onde a lisina (K) substitui a arginina (R) e uma alanina (A) substitui a valina (V) (Kojima e Kangawa, 2005), respectivamente. Neste contexto, a Figura 1 ilustra a estrutura da grelina.

A identificação deste hormônio iniciou-se quando um grupo de pesquisadores, em 1996, clonou um receptor órfão encontrado no hipotálamo e na hipófise de humano, que respondia a um grupo de moléculas sintéticas denominadas Secretagogos do Hormônio de Crescimento (GHS, do inglês: “*growth hormone secretagogues*”) (HOWARD *et al.*, 1996). Estas moléculas possuem a capacidade de estimular a liberação de hormônio de crescimento (GH) (SATO *et al.*, 2012).

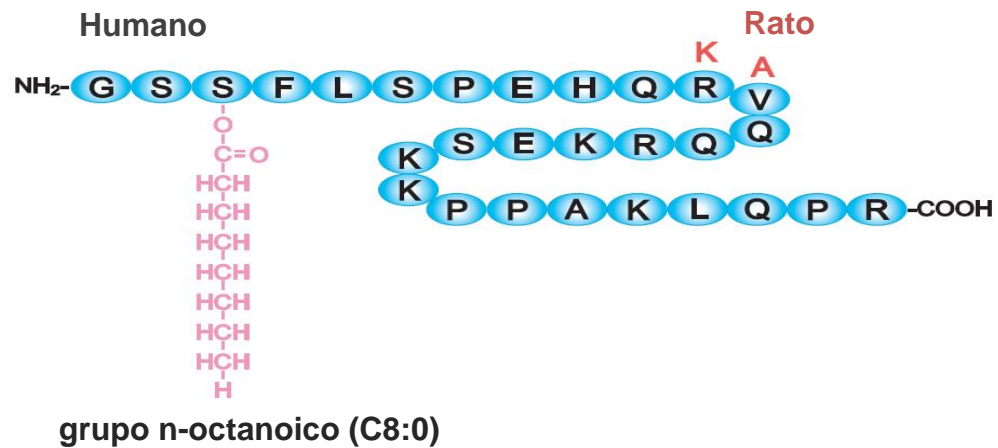


Figura 1. Estrutura da grelina de rato e humano. Ambas possuem 28 aminoácidos na qual a Ser³ é modificada por um ácido graxo, principalmente pelo ácido n-octanoico. Esta modificação é essencial para atividade da grelina. Adaptado de Kojima e Kangawa (2005).

Desde então, Kojima mostrou que a administração de grelina tanto centralmente como via endovenosa, aumentava os níveis circulantes de GH, sendo o grupo n-octanoico (C8:0) presente no terceiro resíduo do aminoácido serina (Ser³) do peptídeo, mostrou-se essencial para esta atividade do hormônio. Então, os pesquisadores purificaram e caracterizaram a grelina como o ligante endógeno para o receptor secretagogo do hormônio de crescimento (GHS-R) (DELPORTE, 2013).

O receptor GHS-R é acoplado à proteína-G (G-Protein Coupled Receptor – GPCR), que atua sobre a glândula pituitária e no hipotálamo (CAO *et al.*, 2013). O gene deste receptor codifica duas isoformas, denominadas, GHS-R1a e GHS-R1b. Entretanto, o receptor GHS-R1a constitui a isoforma funcional ou bioativa para a grelina (MÜLLER *et al.*, 2015). Este receptor é expresso em muitos órgãos, incluindo tecidos gastrointestinal, reprodutivo, linfóide, pancreático e neuronal (BAATAR *et al.*, 2011). No sistema imune, o GHS-R1a também atua em linhagens de células leucêmicas mielóides, células mononucleares de sangue periférico e células T e B em humano (GNANAPAVAN *et al.*, 2002; TAUB *et al.*, 2010).

O gene da grelina em humano está localizado no cromossomo 3 (locus 3p25-26), constituído de 5 éxons e 4 íntrons (LEITE-MOREIRA & SOARES, 2007). O mecanismo de acilação, que associa o processo de produção da grelina e o metabolismo lipídico, é uma das mais importantes etapas na modificação pós-traducional deste hormônio (YANG *et al.*, 2008; TESAURO *et al.*, 2010; NISHI *et al.*,

2011). Duas maiores formas da grelina estão presentes no plasma e no estômago: a grelina acilada e a grelina não-acilada (desacyl-ghrelin) (RODRÍGUEZ, 2014).

Contudo, o hormônio sofre acilação pós-transcriptional no terceiro resíduo de serina (Ser³), resultando na adição do grupo n-octanóico. A acilação é necessária para que a grelina atravesse a barreira hemato-encefálica e ligue-se ao receptor GHS-R, estabelecendo as suas importantes funções fisiológicas e metabólicas (SATO *et al.*, 2012). A enzima responsável pela acilação é a grelina-o-acil-transferase (GOAT) (MÜLLER *et al.*, 2015).

A grelina é produzida predominantemente na camada submucosa do estômago através das glândulas endócrinas oxínticas, mais especificamente, nas células *X/A like* (MÜLLER *et al.*, 2015). No entanto, pequenas quantidades deste hormônio também são produzidas em outros órgãos, tais como: coração, pulmão, rim, pâncreas, placenta, tecido linfático, tireoide, glândula pituitária, hipotálamo, células de defesa (células B, células T e neutrófilos), alguns tecidos neoplásicos e linhagens de células cancerígenas (ZHANG *et al.*, 2010).

1.5.1 Grelina e suas funções

Desde a identificação da grelina, estudos mostram que este hormônio exerce inúmeras funções biológicas, incluindo: efeitos na secreção de hormônios; controle dos níveis de glicose; na função pancreática; na função reprodutiva; na motilidade gástrica; na proliferação celular e sobrevivência; imunidade; inflamação e na função cardiovascular (TAUB, 2008; BAATAR *et al.*, 2011).

A grelina atua como hormônio orexigênico, pois é capaz de estimular o apetite (CUMMINGS *et al.*, 2004). Isto ocorre devido a ativação de neurônios orexigênicos, o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP), presentes no hipotálamo (DE VRIESE & DELPORTE, 2008). Deste modo, estudos experimentais usando camundongos *knock-out*, mostraram que os receptores GHS-R1a foram fundamentais para os efeitos orexigênicos além de estimular a produção de GH controlados pela grelina (SUN *et al.*, 2004). A Figura 2 mostra as funções biológicas da grelina.

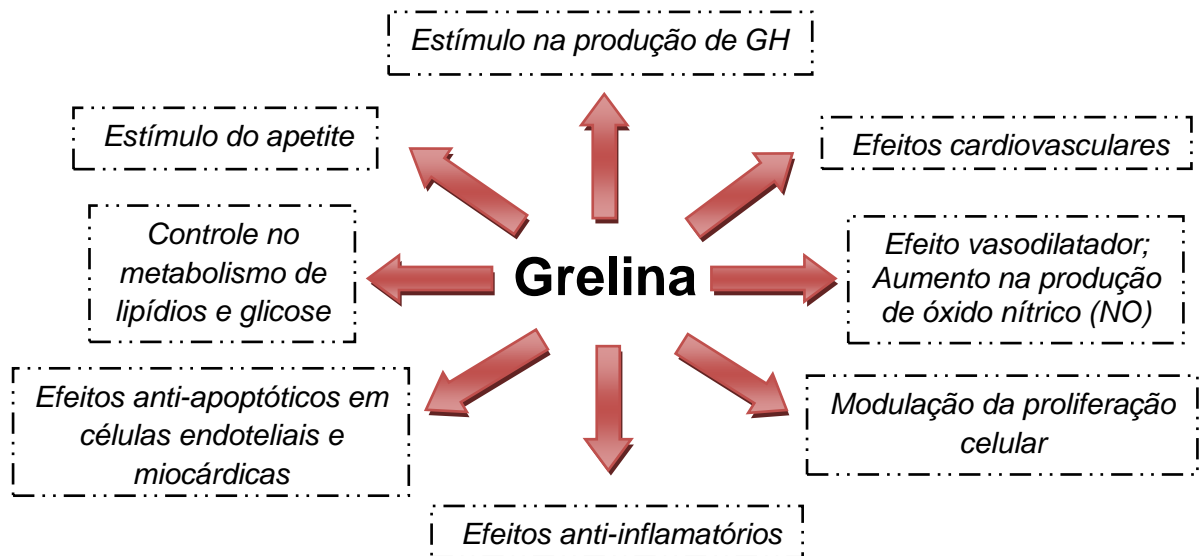


Figura 2. Fluxograma das funções biológicas da grelina. GH, hormônio de crescimento.

Mediante a ação da grelina em estimular a produção de hormônios, este peptídeo também contribui na produção de cortisol, na secreção do hormônio adrenocorticotrófico e prolactina (RAK-MARDYLA, 2013).

A administração aguda de grelina pode aumentar os níveis plasmáticos de glicose e amplificar efeitos de hiperglicemia por arginina (LEITE-MOREIRA & SOARES, 2007). Este mecanismo pode ocorrer por ação da glicogenólise, por produção de catecolaminas ou por efeitos diretos nos hepatócitos, responsáveis por modular a síntese de glicogênio (DE VRIESE & DELPORTE, 2008).

A grelina também pode atuar na função reprodutiva, pois estudos com modelos experimentais demonstram a sua presença na placenta, ovário e endométrio (CAMINOS *et al.*, 2003). Assim, na glândula pituitária e nos testículos, a grelina diminui a produção do hormônio luteinizante e testosterona (GARCÍA *et al.*, 2007).

Alguns aspectos da grelina são descritos com relação à função gastrointestinal. Este hormônio age na secreção exócrina, proteção epitelial e, através do complexo motor migratório, promove a motilidade gástrica (MÜLLER *et al.*, 2015).

A grelina estimula a formação óssea através da diferenciação e proliferação de osteoblastos *in vitro*; inibição de apoptose e aumento da densidade óssea *in vivo* em ratos deficientes ou não de GH (FUKUSHIMA *et al.*, 2005);

aumento da produção de fosfatase alcalina e acúmulo de Ca^{2+} na matriz óssea (MACCARINELLI *et al.*, 2005).

Este hormônio também age na regulação da proliferação celular, tanto em linhagens de células normais quanto neoplásicas. Portanto, a grelina proporciona a proliferação de cardiomiócitos (H9c2), células glomerulosas da zona adrenal humana e osteoblastos (LEITE-MOREIRA & SOARES, 2007).

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar o efeito da grelina na hipotensão, incluindo a supressão da atividade simpática e ação vasodilatadora (LEDDEROSE *et al.*, 2011). O efeito vasodilatador deste hormônio é devido a mecanismos que aumentam a síntese de NO por uma via de sinalização que envolve: a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), a proteína quinase B (AKT), o receptor GHS-R1a, e eNOS (XU *et al.*, 2008). Contudo, experimentos *in vitro* usando células mamárias de humano, demonstraram que a grelina induz vasodilatação por antagonizar mecanismos vasoconstrictores de endotelina-1 (TESAURO *et al.*, 2010).

Várias propriedades da grelina são descritas em relação à sua atuação no sistema cardiovascular. A expressão de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) que codifica este hormônio e seu receptor GHS-R1a são observados no coração e na vasculatura (VIRDIS *et al.*, 2016). Gnanapavan *et al.* (2002) demonstraram por análise de imunohistoquímica, que a detecção de grelina em cardiomiócitos de humano foi capaz de exercer efeitos autócrinos/parácrinos no miocárdio. A grelina possui receptores amplamente distribuídos em tecidos cardiovasculares, portanto, seu efeito cardioprotetor não está ligado somente no estímulo para a produção de GH, mas por sua ação direta no coração (ZHANG *et al.*, 2010).

Outro estudo usando rato como modelo experimental para o procedimento de circulação extracorpórea (CEC) mostrou que o tratamento com grelina reduziu a resposta inflamatória, apoptose e o estresse oxidativo. Portanto, o hormônio proporcionou melhor efeito na função cardíaca nestes animais submetidos ao CEC (CAO *et al.*, 2013).

Contudo, o mecanismo regulador ou cardioprotetor da grelina no sistema cardiovascular pode ser atribuído às funções: proteção do endotélio vascular, ação anti-inflamatória, efeitos anti-oxidativo e anti-apoptótico em células endoteliais e miocárdicas (ZHANG *et al.*, 2009). Estudos usando modelos animais para avaliação de insuficiência cardíaca e cardiomiopatia dilatada, mostraram que a

grelina exerceu melhora no coração. Este resultado contribuiu efetiva função sistólica do ventrículo esquerdo por aumentar a fração de ejeção e o encurtamento fracional, proporcionando um aumento da força de contração da musculatura cardíaca (efeito inotrópico positivo) (SOEKI *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2014).

A grelina também vem sendo estudada em contextos inflamatórios, como por exemplo: a colite, artrite reumatoide e sepse (WU *et al.*, 2009). O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede externa de bactérias gram-negativas que apresenta um importante papel nos efeitos sistêmicos observados nas respostas inflamatórias, como por exemplo, no choque endotoxêmico (BAATAR *et al.*, 2011). Assim, estudos de sepse usando modelos experimentais mostram que a administração da grelina é capaz de atenuar a mortalidade e efeitos inflamatórios induzidos pelo LPS (CHANG *et al.*, 2003; CHORNY *et al.*, 2008; HATTORI, 2009).

No sistema imune, as propriedades anti-inflamatórias da grelina também são estudadas em relação à citocinas. Sendo o hormônio e o receptor GHS-R1a expressos em células imunes, estes exercem importantes efeitos em citocinas pró-inflamatórias (HATTORI, 2009; LEDDEROSE *et al.*, 2011). Dixit *et al.* (2004) e Cao *et al.* (2013) mostraram que a administração de grelina em modelos murinos, exerce uma potente atividade anti-inflamatória por inibir citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL1- α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Vários estudos mostram o papel da grelina em inibir a apoptose celular (VIRDIS *et al.*, 2016). Estes efeitos anti-apoptóticos são observados em cardiomiócitos, células endoteliais aórticas, macrófagos alveolares e neurônios. Estes efeitos também podem ser regulados pela ativação de vias de ativação proteica, como por exemplo, a PI3K/AKT e PKC (proteína quinase C) (DOS SANTOS *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2016).

Huang *et al.* (2016) mostraram que a grelina reduz a apoptose (induzido pelo LPS) de células epiteliais pulmonares (A549) através da ativação das vias proteicas PI3K/AKT e ERK (quinase controlada pela sinalização extracelular). Assim, estas vias de sinalização proteica estão diferentemente envolvidas nos efeitos protetores de grelina, sendo fundamentais para o processo de sobrevivência de muitos tipos celulares (ROSSI *et al.*, 2008; RAK-MARDYLA & GREGORASZCZUK, 2010).

A relação entre grelina e o mecanismo anti-apoptótico, também são conjuntos importantes no que diz respeito à proteção cardíaca. Baldanzi *et al.* (2002) investigaram se a grelina atua como fator de sobrevivência em cardiomiócitos (H9c2) submetidos ao tratamento com doxorubicina. Na presença de grelina (1 μ M) à cultura de células H9c2, o hormônio apresentou atividade citoprotetora, mantendo a morfologia celular e diminuiu o processo de apoptose causado pela doxorubicina.

A grelina também demonstrou ação anti-apoptótica quando o hormônio inibiu a morte celular de cardiomiócitos induzido pela angiotensina II. Assim, este resultado mostra que a grelina exerce uma importante função cardioprotetora (YANG *et al.*, 2012).

Apesar do enorme avanço científico relacionado à biologia do *Trypanosoma cruzi*, diagnóstico e monitoração da doença em pacientes infectados, há ainda uma grande lacuna no que concerne ao tratamento da doença. Assim, tendo em vista a atividade cardioprotetora da grelina, bem como sua função de atuar como um ligante endógeno para o receptor secretagogos do hormônio de crescimento (GHS-R), que por sua vez possui comprovada ação imune, o propósito deste projeto foi avaliar os possíveis efeitos cardioprotetores e imunomoduladores desta substância na infecção chagásica aguda experimental.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o hormônio grelina demonstrou efeitos imunomoduladores e anti-apoptóticos na fase aguda da doença de Chagas experimental. Embora comprovado que este hormônio não reduziu o parasitismo tecidual e os parâmetros eletrocardiográficos, observou-se uma redução do infiltrado inflamatório cardíaco. Diante disto, a grelina em associação com benzonidazol poderia assumir um tratamento coadjuvante para amenizar o dano tecidual causado pela persistente reação inflamatória e de suas consequências clínicas e hemodinâmicas nos pacientes chagásicos.

Os mecanismos de ação da grelina sobre o sistema imunológico, sobretudo no contexto anti-inflamatório, não estão totalmente esclarecidos. Portanto, pesquisas complementares necessitam ser realizadas neste campo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE, J. P. et al. [Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. **Arq Bras Cardiol**, v. 97, n. 2 Suppl 3, p. 1-48, 2011.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **J Exp Med**, v. 200, n. 9, p. 1135-43, Nov 2004.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Des Devel Ther**, v. 4, p. 243-53, Sep 2010.

BAATAR, D.; PATEL, K.; TAUB, D. D. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. **Mol Cell Endocrinol**, v. 340, n. 1, p. 44-58, Jun 2011.

BALDANZI G.; FILIGHEDDU N.; CUTRUPPI S.; CATAPANO F.; BONISSONI S.; FUBINI A.; MALAN D.; BAJ G.; GRANATA R.; BROGLIO F.; PAPOTTI M.; SURICO N.; BUSSOLINO F.; ISGAARD J.; DEGHENGI, R.; SINIGAGLIA F, PRAT.; M, MUCCIOLI G.; GHIGO E.; GRAZIANI A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. **J Cell Biol**. 2002 Dec 23;159(6):1029-37.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World J Exp Med**, v. 3, n. 1, p. 1-10, Feb 2013.

BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Trop**, v. 156, p. 1-16, Apr 2016.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **N Engl J Med**, v. 364, n. 26, p. 2527-34, Jun 2011.

BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSELL, N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years? **Prog Cardiovasc Dis**, v. 52, n. 4, p. 300-16, 2010 Jan-Feb 2010.

BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. Pathways of antigen processing. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 443-73, 2013.

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

BOTONI, F. A. et al. Treatment of Chagas cardiomyopathy. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 849504, 2013.

BRAZÃO, V. et al. Immunomodulatory properties and anti-apoptotic effects of zinc and melatonin in an experimental model of chronic Chagas disease. **Immunobiology**, v. 220, n. 5, p. 626-33, May 2015.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, 1962 Nov-Dec 1962.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 114, n. 2, p. 103-10, Oct 1997.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 5, p. 645-57, Sep 2007.

CAMINOS, J. E. et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1594-602, Apr 2003.

CAO, Y. et al. Cardioprotective Effect of Ghrelin in Cardiopulmonary Bypass Involves a Reduction in Inflammatory Response. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55021, 2013.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-95, Dec 2007.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Front Immunol**, v. 6, p. 659, 2015.

CARREA, A.; DIAMBRA, L. Systems Biology Approach to Model the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146947, 2016.

CARVALHO, C. M. E. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase in Heart Tissue and Nitric Oxide in Serum of *Trypanosoma cruzi*-Infected Rhesus Monkeys: Association with Heart Injury. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, May 2012.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471-9, Aug 2006.

CHANG, L. et al. Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 473, n. 2-3, p. 171-6, Jul 2003.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **J Biomol Screen**, v. 20, n. 1, p. 22-35, Jan 2015.

CHORNY, A. et al. Ghrelin protects against experimental sepsis by inhibiting high-mobility group box 1 release and by killing bacteria. **J Immunol**, v. 180, n. 12, p. 8369-77, Jun 2008.

CHUNG, H. et al. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 beta and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells. **J Endocrinol**, v. 198, n. 3, p. 511-21, Sep 2008.

COLASANTI, M. et al. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). **Int J Mol Med**, v. 9, n. 2, p. 131-4, Feb 2002.

COLLIN, M.; MCGOVERN, N.; HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. **Immunology**, v. 140, n. 1, p. 22-30, Sep 2013.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-82, May 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010 Jul-Aug 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, Jun 2010.

CUMMINGS, D. E. et al. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 2, p. E297-304, Aug 2004.

DA COSTA, C. M. et al. Zinc and pregnancy: Marked changes on the immune response following zinc therapy for pregnant females challenged with *Trypanosoma cruzi*. **Clin Nutr**, v. 32, n. 4, p. 592-8, Aug 2013.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010. DE VRIESE, C.; DELPORTE, C. Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 8, p. 1420-4, 2008.

DE VRIESE, C.; DELPORTE, C. Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 8, p. 1420-4, 2008.

DELPORTE, C. Structure and physiological actions of ghrelin. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013, p. 518909, 2013.

DI GIOVANGIULIO, M. et al. Ghrelin receptor modulates T helper cells during intestinal inflammation. **Neurogastroenterol Motil**, v. 27, n. 11, p. 1542-52, Nov 2015.

DINIZ, L. E. F. et al. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

DIXIT VD.; SCHAFFER EM.; PYLE RS.; COLLINS GD.; SAKTHIVEL SK.; PALANIAPPAN R.; LILLARD JW JR.; TAUB DD. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(1):57-66.

DOS SANTOS, V. V. et al. Ghrelin as a neuroprotective and palliative agent in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 38, p. 6773-90, 2013.

DOS-SANTOS, A. L. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Exp Parasitol**, v. 167, p. 67-75, Aug 2016.

DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 259-62, Jul 2009.

DU, C. K. et al. Survival benefit of ghrelin in the heart failure due to dilated cardiomyopathy. **Pharmacol Res Perspect**, v. 2, n. 5, p. e00064, Oct 2014.

DUTHIE, M. S. et al. Both CD1d antigen presentation and interleukin-12 are required to activate natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 3, p. 1890-4, Mar 2005.

DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 377-87, Aug 2014.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 283-91, Nov 2010.

FANG, M.; ROSCOE, F.; SIGAL, L. J. Age-dependent susceptibility to a viral disease due to decreased natural killer cell numbers and trafficking. **J Exp Med**, v. 207, n. 11, p. 2369-81, Oct 2010.

FERRAZ, M. L. et al. Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 174-9, Jan 2009.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, v. 25, n. 11, p. 1142-9, Nov 2015.

FUKUSHIMA, N. et al. Ghrelin directly regulates bone formation. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 5, p. 790-8, May 2005.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012.

GARCÍA, M. C. et al. Role of ghrelin in reproduction. **Reproduction**, v. 133, n. 3, p. 531-40, Mar 2007.

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

GNANAPAVAN, S. et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 6, p. 2988, Jun 2002.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 115-21, Jul 2009.

GONZALEZ, M. M. et al. Ventricular tachycardia in Chagas heart disease. **Resuscitation**, v. 80, n. 7, p. 728-9, Jul 2009.

GRANATA, R. et al. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol 3-Kinase/Akt signaling. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 512-29, Feb 2007.

GUTIERREZ, F. R. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 236-45, Jul 2009.

HATTORI, N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. **Growth Horm IGF Res**, v. 19, n. 3, p. 187-97, Jun 2009.

HATTORI N, SAITO T, YAGYU T, JIANG BH, KITAGAWA K, INAGAKI C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. **J Clin Endocrinol Metab**. 2001 Sep;86(9):4284-91.

HEMMIGE, V.; TANOWITZ, H.; SETHI, A. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **Int J Dermatol**, v. 51, n. 5, p. 501-8, May 2012.

HOWARD, A. D. et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. **Science**, v. 273, n. 5277, p. 974-7, Aug 1996.

HUANG, C. et al. Ghrelin ameliorates the human alveolar epithelial A549 cell apoptosis induced by lipopolysaccharide. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 474, n. 1, p. 83-90, May 2016.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, Sep 2010.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 12, n. 7, p. 511-7, Jul 2010.

KIM, M. S. et al. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Endocrinol**, v. 18, n. 9, p. 2291-301, Sep 2004.

KOHNO, D. et al. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 948-56, Apr 2003.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656-60, Dec 1999.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physiol Rev**, v. 85, n. 2, p. 495-522, Apr 2005.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 16-34, Feb 2011.

LEDDEROSE, C.; KRETH, S.; BEIRAS-FERNANDEZ, A. Ghrelin, a novel peptide hormone in the regulation of energy balance and cardiovascular function. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov**, v. 5, n. 1, p. 1-6, Jan 2011.

LEE JH.; KIM TJ.; KIM JW.; YOON JS.; KIM HS.; LEE KM. The Anti-apoptotic Effect of Ghrelin on Restraint Stress-Induced Thymus Atrophy in Mice. **Immune Netw**. 2016Aug;16(4):242-8.

LEITE-MOREIRA, A. F.; SOARES, J. B. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin. **Drug Discov Today**, v. 12, n. 7-8, p. 276-88, Apr 2007.

LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 171, n. 1, p. 131-7, May 1994.

MACCARINELLI, G. et al. Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. **J Endocrinol**, v. 184, n. 1, p. 249-56, Jan 2005.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Front Immunol**, v. 3, p. 361, 2012.

MAYA, J. D. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biol Res**, v. 43, n. 3, p. 323-31, 2010.

MECCA, M. M. et al. Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 549-53, Sep 2008.

MUÑOZ, M. J.; MURCIA, L.; SEGOVIA, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 9, n. 1, p. 5-7, Jan 2011.

MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin. **Mol Metab**, v. 4, n. 6, p. 437-60, Jun 2015.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 634-43, May 2012.

NAHREVANIAN, H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. **Braz J Infect Dis**, v. 13, n. 6, p. 440-8, Dec 2009.

NISHI, Y. et al. Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. **Peptides**, v. 32, n. 11, p. 2175-82, Nov 2011.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 367-401, 2001.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, Aug 2004.

OLIVIERI, B. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. **Exp Parasitol**, v. 114, n. 3, p. 228-34, Nov 2006.

PARK, J. M. et al. Suppression of intestinal mucosal apoptosis by ghrelin in fasting rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 233, n. 1, p. 48-56, Jan 2008.

PELLEGRINI, A. et al. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. **Future Microbiol**, v. 6, n. 12, p. 1521-33, Dec 2011.

PIAGGIO, E. et al. Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Parasitol Res**, v. 87, n. 7, p. 539-47, Jul 2001.

PINAZO, M. J.; GASCON, J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). **Acta Trop**, v. 151, p. 16-20, Nov 2015.

PINTO, A. Y. 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]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 6, p. 602-14, 2008 Nov-Dec 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sep 2001.

RAK-MARDYLA, A. Ghrelin role in hypothalamus-pituitary-ovarian axis. **J Physiol Pharmacol**, v. 64, n. 6, p. 695-704, Dec 2013.

RAK-MARDYLA, A.; GREGORASZCZUK, E. L. ERK 1/2 and PI-3 kinase pathways as a potential mechanism of ghrelin action on cell proliferation and apoptosis in the porcine ovarian follicular cells. **J Physiol Pharmacol**, v. 61, n. 4, p. 451-8, Aug 2010.

RASSI, A. et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med**, v. 355, n. 8, p. 799-808, Aug 2006.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010.

REVELLI, S. et al. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clin Exp Immunol**, v. 118, n. 2, p. 271-7, Nov 1999.

RODRÍGUEZ, A. Novel molecular aspects of ghrelin and leptin in the control of adipobiology and the cardiovascular system. **Obes Facts**, v. 7, n. 2, p. 82-95, 2014.

ROSSI, F. et al. Ghrelin induces proliferation in human aortic endothelial cells via ERK1/2 and PI3K/Akt activation. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 2046-51, Nov 2008.

ROTTENBERG, M. E. et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun**, v. 61, n. 12, p. 5129-33, Dec 1993.

RUIZ, R. C. et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **Biochem J**, v. 330 (Pt 1), p. 505-11, Feb 1998.

SATO, T. et al. Structure, regulation and function of ghrelin. **J Biochem**, v. 151, n. 2, p. 119-28, Feb 2012.

SCORZA C, SCORZA JV. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after infection. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 1972 May-Jun.

SEINO, K.; TANIGUCHI, M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1623-6, Dec 2005.

SHIRSHEV, S. V. et al. Roles of leptin and ghrelin in the regulation of the phenotype and cytokine production by NK cells from peripheral blood. **Dokl Biol Sci**, v. 470, n. 1, p. 249-252, Sep 2016.

SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folia clin. biol.**, **20**:191-207, 1953.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci**, v. 8, p. s314-25, May 2003.

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 Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012.

SOEKI, T. et al. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 294, n. 1, p. H426-32, Jan 2008.

SOUFLI, I. et al. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**, v. 7, n. 3, p. 353-60, Aug 2016.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 317, 2014.

SUN, J. C.; LANIER, L. L. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? **Eur J Immunol**, v. 39, n. 8, p. 2059-64, Aug 2009.

SUN, Y. et al. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 13, p. 4679-84, Mar 2004.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 430-434, Aug 2007.

_____. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 3, p. 233-8, May 2015.

TARLETON, R. L. et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1820-9, May 1994.

TATAKIHARA, V. L. et al. Nitric oxide-releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia. **Chem Biol Interact**, v. 227, p. 104-11, Feb 2015.

TAUB, D. D. Neuroendocrine interactions in the immune system. **Cell Immunol**, v. 252, n. 1-2, p. 1-6, 2008 Mar-Apr 2008.

TAUB, D. D.; MURPHY, W. J.; LONGO, D. L. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. **Curr Opin Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 408-24, Aug 2010.

TEIXEIRA, A. R. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 3, p. 592-630, Jul 2011.

TESAURO, M. et al. Cardiovascular and metabolic effects of ghrelin. **Curr Diabetes Rev**, v. 6, n. 4, p. 228-35, Jul 2010.

VAN DER LELY, A. J. et al. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. **Endocr Rev**, v. 25, n. 3, p. 426-57, Jun 2004.

VAN KAER, L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 3, p. 354-64, Jun 2007.

VIDAL, J. C. et al. Loss of the cytostome-cytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **J Struct Biol**, v. 196, n. 3, p. 319-328, Dec 2016.

VIRDIS, A. et al. Human Ghrelin: A Gastric Hormone with Cardiovascular Properties. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 1, p. 52-8, 2016.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 5, p. 516-25, Nov 2008.

VIVEROS-PAREDES, J. M. et al. Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is associated with immunosuppression induced by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 5, p. 774-81, May 2006.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 7, p. 1245-63, Apr 2014.

WANG, J. X. et al. Investigation of the immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. **Br J Pharmacol**, v. 150, n. 5, p. 652-61, Mar 2007.

WASEEM T, DUXBURY M, ITO H, ASHLEY SW, ROBINSON MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. **Surgery**. 2008 Mar;143(3):334-42.

WHO - World Health Organization. Chagas Disease (American trypanosomiasis), disponível em: < <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >, Acesso em 25 dez. 2016.

WU, R. et al. Orexigenic hormone ghrelin ameliorates gut barrier dysfunction in sepsis in rats. **Crit Care Med**, v. 37, n. 8, p. 2421-6, Aug 2009.

XAUS, J. et al. The expression of MHC class II genes in macrophages is cell cycle dependent. **J Immunol**, v. 165, n. 11, p. 6364-71, Dec 2000.

XIA Q, PANG W, PAN H, ZHENG Y, KANG JS, ZHU SG. Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice. **Regul Pept**. 2004 Nov 15;122(3):173-8.

XU, X. et al. Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. **Endocrinology**, v. 149, n. 8, p. 4183-92, Aug 2008.

YANG, C. et al. Mechanisms of Ghrelin anti-heart failure: inhibition of Ang II-induced cardiomyocyte apoptosis by down-regulating AT1R expression. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85785, 2014.

_____. Ghrelin protects H9c2 cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis through the endoplasmic reticulum stress pathway. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 59, n. 5, p. 465-71, May 2012.

YANG, J. et al. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 387-96, Feb 2008.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc**, v. 78, n. 1, p. 87-111, Mar 2006.

ZHANG, G. et al. **Ghrelin and cardiovascular diseases**. 2010.

ZHANG, G. G. et al. Inhibition of endoplasm reticulum stress by ghrelin protects against ischemia/reperfusion injury in rat heart. **Peptides**, v. 30, n. 6, p. 1109-16, Jun 2009.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 1, p. 102-9, Jan 1996.

ZUCCHINI, N. et al. Natural killer cells in immunodefense against infective agents. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 6, n. 6, p. 867-85, Dec 2008.

ZULANTAY, I. et al. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 101, n. 8, p. 673-9, Dec 2007.