



**Universidade de Brasília – UnB**

**Faculdade de Medicina**

**Pós-Graduação em Ciências Médicas**

**Laboratório Interdisciplinar de Biociências - LabIBC**

ANA CAROLINA DE CASTRO NOBRE

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ERITROPOIETINA NA  
INFECÇÃO MURINA PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

Brasília – DF,

2019

ANA CAROLINA DE CASTRO NOBRE

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ERITROPOIETINA NA  
INFECÇÃO MURINA PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada como requisito á  
obtenção do grau Mestre em Ciências Médicas,  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Médicas, Universidade de Brasília-UnB.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nadjar Nitz Silva  
Lociks de Araújo

**Coorientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Luciana Hagström-  
Bex.

Brasília – DF,

2019

ANA CAROLINA DE CASTRO NOBRE

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ERITROPOIETINA NA  
INFECÇÃO MURINA PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada como requisito á  
obtenção do grau Mestre em Ciências Médicas,  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Médicas, Universidade de Brasília-UnB.

Brasília - DF, 17 de dezembro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo (Orientadora/Presidente)

Universidade de Brasília- UnB

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Nunes Araújo (Membro)

Universidade de Brasília- UnB

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elza Ferreira Noronha (Membro)

Universidade de Brasília- UnB

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thaís Tâmara Castro e Souza Minuzzi (Suplente)

Universidade de Brasília- UnB

## **ÓRGÃOS FINANCIADORES**

Este trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: FAPDF / CNPq / CAPES

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente, ao nosso Senhor Jesus Cristo,  
dedico também aos meus amados pais Jaqueline e Júlio,  
meu querido irmão Gabriel,  
meus sobrinhos Maria e João,  
e a meu amado esposo Pedro Torres.

*“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”.*

Ana Vilela

## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo dessa caminhada pude estar ao lado de professores excelentes, amigos e colegas, que me ensinaram a amadurecer e a lutar por um ideal. Hoje, vejo que meus sonhos estão sendo realizados.

Agradeço primeiramente a Deus que sempre esteve ao meu lado, nas minhas fraquezas e medos, nas lutas, nas grandes vitórias e derrotas. Sei que o senhor está ao meu lado agora, então, obrigado por este momento, obrigado por tudo que eu pude ver, ouvir e aprender.

À minha orientadora Nadjar Nitz, sempre acolhedora e prestativa. Tenho uma grande admiração e respeito ao seu trabalho. Uma pessoa doce e amável. Obrigada por fazer parte desse momento especial em minha vida.

À minha co-orientadora Luciana Hagstrom, por confiar em mim na realização desse trabalho, por todo o conhecimento transferido, orientações, compreensão e incentivo ao longo do desenvolvimento desse trabalho e principalmente por me preparar para a vida científica. Obrigada pela contribuição no meu crescimento pessoal e profissional.

À professora Mariana Hecht, a quem eu tenho uma gratidão imensa, pois foi a primeira pessoa que me recebeu no laboratório e sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas. Obrigada por todo carinho sempre.

Agradeço aos meus pais, Jaqueline e Júlio, que me cobriram de amor, dedicação e carinho. Obrigada por vocês se doarem inteiros e abdicarem seus sonhos para que muitas vezes eu pudesse realizar os meus. Eu amo muito vocês.

Ao meu esposo Pedro Torres, pelo imenso carinho em seu olhar de compreensão e colaboração, pois todo seu estímulo e amor foram essenciais para essa grande vitória. Obrigada por ter compartilhado lágrimas e sorrisos, e hoje, podemos dividir o mérito desta conquista juntos.

As minhas grandes amigas Hanid Versiani e Geysa Stefanne, por me acolherem sempre que precisei e mais ainda, sempre se mostraram disponíveis a me ajudar ao longo dessa trajetória. E principalmente por me acompanhar desde a faculdade.

Aos meus estagiários Jennifer Jovita e Rafael Faleiro, que se tornaram queridos amigos, sou muito grata por ter conhecido vocês. Aos colegas adquiridos no laboratório, Fernando Pimentel, Danielle Marques, Maria Aparecida, Zenilda Amorim, Laise, Mônica, Bruna Caroline, Tamires Vital, Aline Moraes, Taís Milene, Moisés, Ester, Tayane Nobre, Thais Minuzzi, Marcelle, Nayra, Andressa, Jéssica, Rosinha e Nélio que de alguma forma contribuíram para minha pesquisa. Obrigada pelo companheirismo, apoio, disponibilidade em ajudar e auxiliar. Sucesso na vida de todos vocês!

Aos profissionais, Ana de Cássia, Isabela Teotônio, Bruno Dallago, Rafael Andrade, George Magno, Glaucia Bueno Pereira, Márcio Botelho de Castro, Giane Paludo, Prof Pratesi, obrigada por me ajudarem com todo o conhecimento, admiro muito o trabalho de vocês.

A todos aqueles que contribuíram, direta e indiretamente, para a construção e conclusão desse trabalho.

Muito obrigada!



## RESUMO

**Introdução:** A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta aproximadamente oito milhões de pessoas em todo o mundo. Cerca de um terço dos indivíduos com a infecção crônica desenvolve a cardiomiopatia chagásica, manifestação clínica mais importante da doença, principal responsável pela letalidade. As drogas tripanocidas, apesar de reduzirem a parasitemia na fase aguda, não possuem eficácia sobre a fase crônica e na progressão das lesões no coração. A eritropoietina (Epo), glicoproteína que regula a produção de eritrócitos, possui efeito cardioprotetor reduzindo o processo de apoptose, inflamação e isquemia do miocárdio. **Objetivo:** Investigar o possível efeito cardioprotetor da Epo na infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi*. **Métodos:** Foram utilizados 52 camundongos fêmeas C57BL/6 uniformes quanto ao peso e idade. Os animais foram aleatoriamente divididos em oito subgrupos experimentais separados em dois grandes grupos: **1.** Administração de salina ou Epo na fase aguda da infecção (n=28); **2.** Administração de salina ou Epo na fase crônica da infecção (n=24). Os animais infectados receberam injeção intraperitoneal (ip) com  $10^5$  tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. Os animais tratados com Epo receberam 2000 U/kg ip em dias alternados durante 30 dias após a infecção, sendo eutanasiados com 180 dias pós-infecção. Foi realizado hemograma no dia 0 (d0) e no dia 180 (d180). Dosagem sérica de enzimas marcadores de danos cardíacos foi realizada em d0, d15, d90 e d180. A avaliação do funcionamento cardíaco foi realizada através de ecocardiograma. Foi utilizada a PCR quantitativa (qPCR) para determinar a carga parasitária no coração, sangue, baço e intestino grosso. Por fim, análise histopatológica foi realizada para avaliação de alteração tecidual. **Resultados:** Como esperado, o hematócrito foi significativamente maior logo após o tratamento com Epo, mas este retornou aos valores pré-tratamento em d180. A maioria dos parâmetros hematológicos estavam dentro dos valores de referência, mesmo com a infecção e/ou tratamento com Epo. A dosagem de enzimas bioquímicas apresentou grande variabilidade intra-grupo, não sendo possível traçar a cinética ao curso da infecção. De interesse, a administração de Epo fez com que os níveis de creatina quinase fração miocárdica (CK-MB) fossem significativamente menores em comparação aos animais que receberam salina. A fração de ejeção foi normal em 100% dos animais infectados tratados com Epo na fase crônica. O mesmo só foi observado no grupo de camundongos não infectados tratados com Epo na fase aguda. A análise histopatológica cardíaca confirmou os achados da bioquímica e da ecografia para o grupo de animais infectados e tratados com Epo na fase crônica.

Entretanto, quando os camundongos infectados foram tratados na fase aguda, foi observado necrose, fibrose e intenso infiltrado inflamatório no coração. A carga parasitária foi maior no coração entretanto, o número de parasitos tendeu a ser mais elevado nos grupos infectados tratados com Epo. **Conclusão:** Alguns dos parâmetros avaliados sugeriram um efeito cardioprotetor da Epo na doença de Chagas murina. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar seu real interesse nas infecções pelo *T. cruzi*.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Cardiomiopatia, Tratamento, Eritropoietina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects approximately eight million people worldwide. About one third of patients with chronic infection in chagasic cardiomyopathy, the most important clinical manifestation of the disease, mainly responsible for lethality. Like trypanocidal drugs, although they reduce parasitemia in the acute phase, they cannot affect the chronic phase and the progress of heart lesions. Erythropoietin (Epo), a glycoprotein that regulates the production of erythrocytes, has a cardioprotective effect on the use or process of apoptosis, inflammation and myocardial ischemia. **Objective:** To investigate the possible cardioprotective effect of Epo on murine infection by *Trypanosoma cruzi*. **Methods:** Fifty-two uniform C57BL / 6 female mice were used for weight and age. The animals were randomly divided into eight experimental subgroups separated into two large groups: **1.** Administration of saline or Epo in the acute phase of infection (n = 28); **2.** Administration of saline or Epo in the chronic phase of infection (n = 24). The infected animals received intraperitoneal (ip) injection with 105 trypomastigotes of the *T. cruzi* Colombian strain. Animals treated with Epo received 2000 U / kg ip every other day for 30 days after infection and were euthanized 180 days after infection. Blood count was performed on day 0 (d0) and on day 180 (d180). Serum dosing of cardiac damage marker enzymes was performed at d0, d15, d90 and d180. Cardiac function was assessed by echocardiography. Quantitative PCR (qPCR) was used to determine the parasitic load on the heart, blood, spleen and large intestine. Finally, histopathological analysis was performed to evaluate tissue alteration. **Results:** As expected, hematocrit was significantly higher soon after treatment with Epo, but it returned to pretreatment values at d180. Most hematological parameters were within the reference values, even with infection and / or treatment with Epo. The dosage of biochemical enzymes showed great intra-group variability, and it was not possible to trace the kinetics to the course of the infection. Of interest, administration of Epo caused myocardial fraction creatine kinase (CK-MB) levels to be significantly lower compared to animals receiving saline. Ejection fraction was normal in 100% of infected animals treated with Epo in the chronic phase. The same was observed only in the group of uninfected mice treated with Epo in the acute phase. Cardiac histopathological analysis confirmed the findings of biochemistry and ultrasound for the group of animals infected and treated with Epo in the chronic phase. However, when infected mice were treated in the acute phase, necrosis, fibrosis and intense inflammatory infiltrate were observed in the heart. Parasitic burden was

higher in the heart; however, the number of parasites tended to be higher in infected groups treated with Epo. **Conclusion:** Some of the evaluated parameters suggested a cardioprotective effect of Epo on murine Chagas disease. However, further studies are needed to prove their real interest in *T. cruzi* infections.

**Keys words:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Cardiomyopathy, Treatment, Erythropoietin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Distribuição global da doença de Chagas entre os anos de 2006 a 2010.	<b>23</b>
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática de formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	<b>25</b>
<b>Figura 3.</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b>	Curso natural da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .	<b>29</b>
<b>Figura 5.</b>	Tecidos alvo da eritropoietina (Epo).	<b>38</b>
<b>Figura 6.</b>	Desenho experimental do estudo sobre o efeito terapêutico da eritropoietina na doença de Chagas.	<b>43</b>
<b>Figura 7.</b>	Linha temporal com os principais experimentos realizados para os grandes grupos avaliando o possível efeito protetor e terapêutico da eritropoietina (Epo).	<b>47</b>
<b>Figura 8.</b>	(A) Ganho de peso absoluto ao longo do período experimental. (B) Ganho de peso relativo (razão peso corporal final/peso corporal inicial).	<b>52</b>
<b>Figura 9.</b>	Forma tripomastigota visualizada em esfregaço sanguíneo com sangue periférico de animal infectado pelo <i>T. cruzi</i> corado com hematoxilina-eosina.	<b>53</b>
<b>Figura 10.</b>	Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) nos diferentes grupos experimentais.	<b>59</b>
<b>Figura 11.</b>	Níveis séricos de creatina kinase total (CK) nos diferentes grupos experimentais.	<b>60</b>
<b>Figura 12.</b>	Níveis séricos de creatina kinase fração miocárdica (CK-MB) nos diferentes grupos experimentais.	<b>62</b>
<b>Figura 13.</b>	Curva padrão a partir da amplificação de amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i> com concentrações variadas.	<b>65</b>
<b>Figura 14.</b>	Padrão das curvas de dissociação e amplificação das amostras.	<b>66</b>
<b>Figura 15.</b>	Fotos do coração coletado após eutanásia ilustrando a semelhança de morfologia e tamanho no órgão em diferentes grupos experimentais.	<b>68</b>
<b>Figura 16.</b>	Cortes histológicos do tecido cardíaco de camundongos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> , tratados ou não com eritropoietina	<b>69</b>
<b>Figura 17.</b>	Cortes histológicos do tecido cardíaco de camundongos não infectados e infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados ou não com eritropoietina.	<b>70</b>
<b>Figura 18.</b>	Ninho de amastigotas no tecido cardíaco de camundongos infectado pelo <i>T. cruzi</i> .	<b>71</b>
<b>Figura 19.</b>	Fotos do baço coletado após eutanásia mostrando esplenomegalia	<b>72</b>

nos grupos infectados pelo *T. cruzi*, sem efeito da eritropoietina.

**Figura 20.** Cortes histológicos do tecido esplênico de camundongos não infectados e infectados pelo *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com eritropoietina. **73**

**Figura 21.** Cortes histológicos do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. **75**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Avaliação da influência da administração de eritropoietina no hematócrito dos diferentes grupos experimentais.	<b>54</b>
<b>Tabela 2.</b>	Parâmetros hematológicos da série vermelha no início e no final do período experimental.	<b>55</b>
<b>Tabela 3.</b>	Avaliação da série branca com contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilose bastonetes).	<b>57</b>
<b>Tabela 4.</b>	Efeito da interação entre infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> e período experimental na atividade da enzima aspartato aminotransferase (U/L).	<b>58</b>
<b>Tabela 5.</b>	Grau de comprometimento cardíaco utilizando como parâmetro a fração de ejeção do ventrículo esquerdo no final do período experimental.	<b>63</b>
<b>Tabela 6.</b>	Análise da carga parasitária nos grupos experimentais e nos diferentes tecidos (sangue, coração, baço e intestino).	<b>67</b>
<b>Tabela 7.</b>	Análise histopatológica para a detecção de alterações existentes nos diversos tecidos (coração, baço e intestino grosso)	<b>76</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>AZT</b>	Zidovudina
<b>BNZ</b>	Benznidazol
<b>CCC</b>	Cardiomiopatia chagásica crônica
<b>CDC</b>	Centro de controle e prevenção de doenças
<b>CEMIB</b>	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CFC-E</b>	Células formadoras de colônia de eritrócitos
<b>CK</b>	Creatina quinase total
<b>CK-MB</b>	Creatina quinase fração miocárdica
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>cPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
<b>Cq</b>	Ciclo de quantificação, do inglês <i>Quantification cycle</i>
<b>CYP51</b>	Inibidores da C-14 $\alpha$ -demetilase
<b>DC</b>	Doença de Chagas
<b>DCA</b>	Doença de Chagas aguda
<b>DCC</b>	Doença de Chagas crônica
<b>DIVED</b>	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole
<b>DIVES</b>	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole
<b>DMEM</b>	Meio mínimo essencial
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DTNs</b>	Doenças tropicais negligenciadas
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
<b>Epo</b>	Eritropoietina
<b>EpoR</b>	Receptor da eritropoietina



<b>ETT</b>	Ecocardiograma transtorácica
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FE</b>	Fração de ejeção
<b>Fet</b>	Fração de encurtamento
<b>HAI</b>	Hemaglutinação indireta
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HGB</b>	Concentração de hemoglobina
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>I</b>	Infectado
<b>IAM</b>	Infarto agudo do miocárdio
<b>IFI</b>	Imunofluorescência indireta
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>kDNA</b>	<i>Kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>NI</b>	Não infectado
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigênio
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em cadeia)
<b>PECAM-1</b>	<i>Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PLVED</b>	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na diástole
<b>PLVES</b>	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na sístole
<b>PNPIC</b>	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
<b>Qc</b>	Débito cardíaco

<b>qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
<b>RBC</b>	Red blood cells (hemácias)
<b>rHuEpo</b>	Eritropoietina recombinante humana
<b>S</b>	Salina
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SUS</b>	Sistema único de Saúde
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TE</b>	Tampão de Eluição
<b>UnB</b>	Universidade de Brasília
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>VE</b>	Ventrículo esquerdo
<b>WBC</b>	<i>White blood cells</i> (leucócitos)

# SUMÁRIO

<i>I. INTRODUÇÃO</i> .....	22
1. Doença de Chagas .....	22
1.1 Aspectos epidemiológicos .....	22
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
1.3 Ciclo biológico .....	25
1.4 Vias de transmissão .....	26
2. Manifestações Clínicas .....	28
2.1 Fase aguda.....	28
2.2 Fase crônica.....	30
3. Diagnóstico .....	31
4. Tratamento .....	32
4.1 Drogas tripanocidas .....	32
4.2 Reposicionamento de fármacos.....	33
4.3 Combinação de fármacos.....	35
4.4 Novas drogas.....	36
5. Eritropoietina .....	36
5.1 Funções da eritropoietina.....	37
5.2 Efeitos adversos.....	39
<i>II. JUSTIFICATIVA</i> .....	40
<i>III. OBJETIVO</i> .....	41
1. Objetivo Geral.....	41
2. Objetivos Específicos .....	41
<i>IV. METODOLOGIA</i> .....	42
1. Amostragem.....	42
1.1 Grupos experimentais .....	42

2. Administração de salina e eritropoietina .....	43
3. Cultura do <i>Trypanosoma cruzi</i> e infecção dos animais.....	44
4. Confirmação da infecção .....	44
5. Análises Hematológicas .....	44
6. Dosagens Bioquímicas .....	45
7. Ecocardiograma .....	45
8. Coleta de tecidos .....	46
9. Extração de DNA.....	47
9.1 Extração de DNA total de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
9.2 Extração de DNA de tecido .....	47
9.3 Quantificação e análise do DNA extraído .....	48
10. Quantificação da carga parasitária .....	48
10.1 Curva padrão .....	49
10.2 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real das amostras .....	49
11. Análise Histopatológica.....	50
12. Análise Estatística .....	50
V. RESULTADOS.....	51
1. Peso Corporal.....	51
2. Confirmação da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	53
3. Hematócrito .....	53
4. Avaliação Hematológica .....	54
5. Avaliação Bioquímica .....	58
5.1. Aspartato aminotransferase.....	58
5.2. Creatina quinase total .....	59
5.3 Creatina quinase fração miocárdica.....	60
6. Parâmetros ecográficos.....	62
7. PCR quantitativa .....	64

7.1 Curva padrão para determinação da carga parasitária .....	64
7.2 Quantificação de DNA do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	65
8. Avaliação Histopatológica.....	67
<i>VI. DISCUSSÃO</i> .....	77
<i>VII. CONCLUSÃO</i> .....	86
<i>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	88

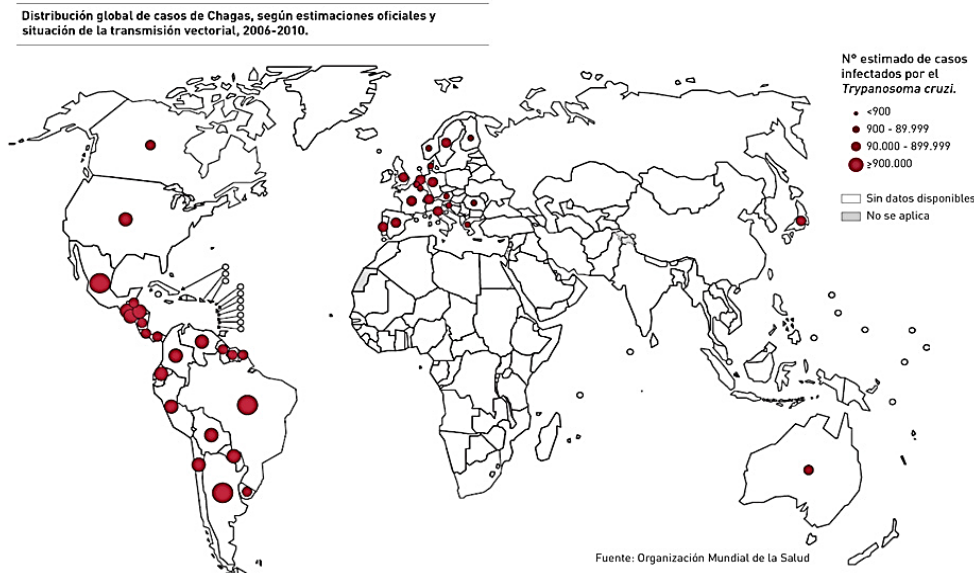
# I. INTRODUÇÃO

## 1. Doença de Chagas

### *1.1 Aspectos epidemiológicos*

A doença de Chagas (DC) foi descoberta por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas em abril de 1909, na cidade Lassance, interior de Minas Gerais. Conhecida também como Tripanossomíase Americana, é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). É uma doença tropical negligenciada, constituindo um grande problema de saúde pública, com alta morbidade e mortalidade em regiões endêmicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de oito milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, com mais de 10 mil mortes por ano (OMS, 2018).

Durante muito tempo a DC foi considerada uma patologia de prevalência restrita a países latino-americanos. No entanto, devido a migração populacional ela tem sido encontrada em regiões não endêmicas, estando presente em mais de 21 países como nos Estados Unidos da América (EUA), no Canadá e em diversos países da Europa e do Pacífico Ocidental (OMS, 2017) (Figura 1).



**Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas entre os anos de 2006 a 2010.** Este mapa evidencia a distribuição da doença de Chagas na América Latina e mostra sua distribuição em outros locais do mundo devido aos processos migratórios em crescente processo. Os círculos de cor vermelha apresentam os locais com números significativos da doença. Quanto maior o círculo, mais casos são relatados no local. Os locais em branco são os lugares em que não existem dados disponíveis (adaptado de OMS, 2013).

Na Europa, a maior parte dos imigrantes de áreas endêmicas de DC está na Itália, no Reino Unido, na Espanha, na França e na Suíça. Acredita-se que neste continente a DC apresenta uma prevalência geral de 4,2%. Foram verificadas elevadas taxas de infecção principalmente em indivíduos imigrantes da Bolívia. Em grande parte dos países europeus é observada a escassez de programas de rastreamento e a dificuldade ao acesso ao diagnóstico e ao tratamento (Antinori *et al.*, 2017).

Nos EUA, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) classificou a DC como uma das cinco infecções parasitárias negligenciadas, incluindo-a no grupo de patologias que devem ser alvo de ações de saúde pública. Segundo estimativas preliminares, os EUA ocupam o sétimo lugar no Hemisfério Ocidental em número de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (Bern; Montgomery, 2009; Malik *et al.*, 2015).

No Brasil, aproximadamente 1,2 a 4,6 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* (Martins-Melo *et al.*, 2014) e 21,8 milhões de pessoas estão expostas ao risco em áreas endêmicas (OMS, 2015), causando aproximadamente 6000 mortes anuais, a maioria delas

devido às formas cardíacas da doença (Martins-Melo *et al.*, 2012a, 2012c). Para o ano de 2020, estima-se em 3,2 milhões de pessoas infectadas.

Entretanto, o número de casos vem sendo reduzido nos últimos anos, principalmente devido a diminuição da transmissão vetorial intradomiciliar e ao controle da transmissão via transfusão de sangue (Martins-Melo *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2016). Contudo, vários surtos causados por esse parasita têm sido notificados, especialmente na região Norte do país. A maioria deles se refere à infecção por via oral através de alimentos contaminados. Em 2016, por exemplo, o número de casos comprovados de DC no Acre aumentou mais de 200% em sete meses em relação ao registrado durante todo o ano de 2015 (Inst. Bio. Fiocruz, 2016).

## 1.2 *Trypanosoma cruzi*

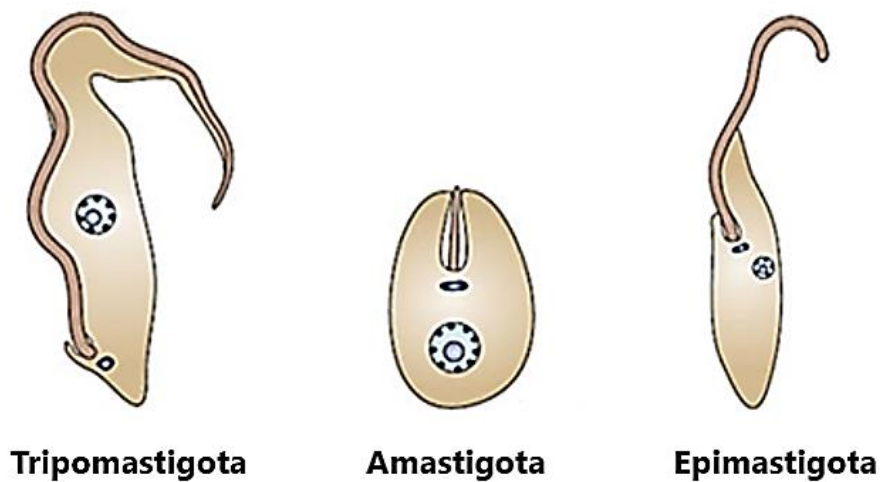
O *T. cruzi* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, apresentando flagelo único e uma grande mitocôndria diferenciada denominada cinetoplasto, que contém DNA circular (kDNA) (Brenner, 1997). O parasito apresenta um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados, desenvolvendo diferentes formas evolutivas de acordo com a fase do ciclo e do hospedeiro (Walker *et al.*, 2014).

As variações morfológicas e evolutivas do parasito são definidas pelos seguintes aspectos: forma da célula, local de fixação do flagelo e posicionamento do corpo basal e do cinetoplasto em relação ao núcleo (Brenner, 1997). Nos mamíferos são encontradas as formas tripomastigota (infectiva) e amastigota intracelular que é a forma multiplicativa (por divisão binária). No triatomíneo é encontrado epimastigota que é a forma multiplicativa localizada no intestino do vetor e também tripomastigota metacíclico que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Teixeira *et al.*, 2006).

A Figura 2 apresenta as três principais formas morfológicas. O tripomastigota é uma forma alongada e levemente achatada, com o cinetoplasto afastado e posterior ao núcleo, o qual é centralizado e ovalado. O flagelo emerge da bolsa flagelar, percorre toda a extensão lateral do parasito formando uma membrana ondulante tornando-se livre na porção anterior. As amastigotas são ovóides, com núcleo centralizado e arredondado. De sua bolsa flagelar emerge um reduzido flagelo; entre o núcleo e o flagelo encontra-se o cinetoplasto. A forma



epimastigota é alongada e fusiforme. Próximo à saída do flagelo, encontra-se o cinetoplasto em forma de bastão, localizado posterior e próximo ao núcleo (Teixeira *et al.*, 2012).



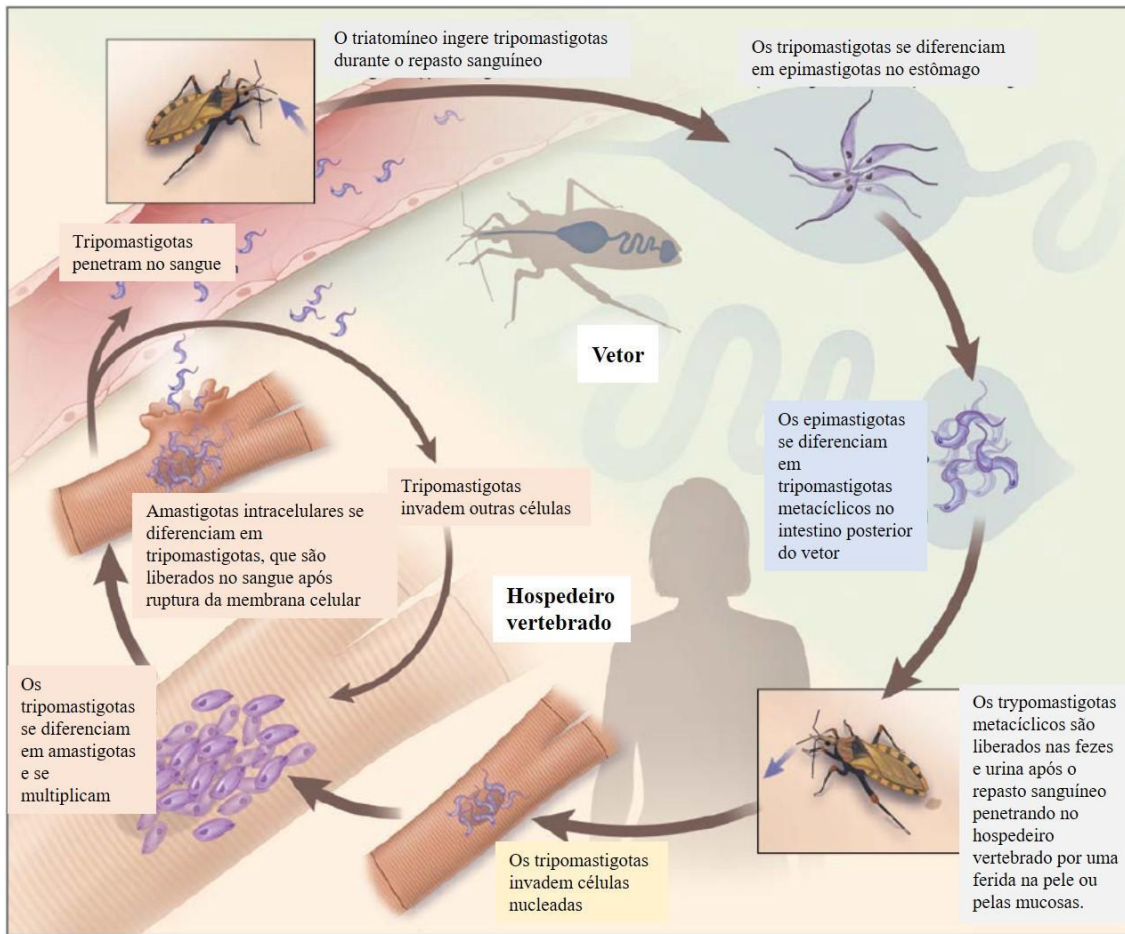
**Figura 2.** Representação esquemática de formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de Vargas-Parada, 2010).

### 1.3 Ciclo biológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado (Figura 3). Em geral, o ciclo biológico do parasito se inicia quando formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas pelo triatomíneo (inseto vetor) no momento do repasto sanguíneo em mamíferos infectados. Uma vez ingeridos, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas. Esses epimastigotas migram para o intestino, onde se dividem intensamente por divisão binária longitudinal e se aderem à membrana perimicrovilar. Esta etapa de adesão é essencial para desencadear o processo de transformação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos na parte final do intestino do vetor, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (Souza *et al.*, 2010).

A infecção nos mamíferos ocorre quando o triatomíneo libera fezes e urina contaminadas com tripomastigotas metacíclicas, logo após a hematofagia. Assim, no momento em que o hospedeiro coça a ecoriação, a forma infectante pode penetrar em seu organismo. Além disso, outra forma de entrada é através das mucosas ou lesões pré-existentes. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitos circulantes invadem as células

retículo-endoteliais e do tecido conjuntivo, se diferenciam em amastigotas e começam a se multiplicar por divisão binária. Então, quando as células estão abarrotadas de amastigotas, os protozoários se diferenciam em tripomastigotas. Os tripomastigotas lisam as células, invadem tecidos adjacentes e se espalham através dos vasos linfáticos e pela corrente sanguínea, migrando para outros locais. O ciclo se reinicia quando formas sanguíneas são ingeridas pelo vetor, como podemos observar na Figura 3 (Rassi Jr *et al.*, 2012). Vale ressaltar, que além da transmissão vetorial, há outras formas do homem adquirir o parasito.



**Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de Bern, 2015).**

#### 1.4 Vias de transmissão

Diferentemente de várias doenças que são transmitidas por insetos hematófagos, a infecção pelo *T. cruzi* não acontece pela inoculação direta do agente pela saliva do triatomíneo. No ser humano, ela ocorre principalmente por meio da eliminação de tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto vetor infectado, no momento ou

logo após a sucção sanguínea. Estas penetram no orifício causado pela picada ou em outros locais em que a pele não esteja íntegra (Roque; Jansen, 2014).

Existem mais de 100 espécies de mamíferos que servem de reservatório para o *T. cruzi* e cerca de 152 espécies de triatomíneos identificadas como vetores potenciais para o parasita na natureza. Estas estão distribuídas em 18 gêneros como *Panstrongylus* (15 espécies), *Triatoma* (73 espécies) e *Rhodnius* (21 espécies), que são consideradas epidemiologicamente importantes na transmissão do *T. cruzi*, embora outros 15 gêneros de 43 espécies também sejam capazes de transmitir o agente etiológico da doença de Chagas (Poinar, 2013; Galvão, 2014; Mendonça *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2017). O controle de triatomíneos é a principal estratégia utilizada para prevenir a transmissão vetorial. A identificação de áreas com maior vulnerabilidade de ocorrência da DC transmitidas por vetores é essencial para prevenção, controle e vigilância (Vinhaes *et al.*, 2014).

Além da transmissão vetorial, as infecções pelo *T. cruzi* podem ser adquiridas por via oral, transfusional, congênita, transplante de órgãos e acidentalmente. A transmissão por via oral, através da ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*, vem demonstrando um papel importante na epidemiologia da DC. Desde 1920, modelos experimentais no Brasil mostram a existência da transmissão por via oral. O primeiro caso em humanos no Brasil foi descrito no Rio Grande do Sul em 1960. Em seguida, foram relatados surtos na Bahia, na Paraíba, no Ceará, no Rio Grande do Norte, Amazonas, Pará e em Santa Catarina (Dias; Neto, 2011; Noya *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018; Santana *et al.*, 2019).

Já a transmissão vertical ou congênita ocorre através da placenta, da mãe infectada para o feto. Têm sido notificados anualmente mais de 14 mil casos da infecção por essa via na América do Sul e Central, especialmente no Chile, Uruguai, Paraguai, Argentina e Bolívia (Sánchez; Ramírez, 2013; Howard *et al.*, 2014). Diante desses fatores, eleva-se a importância do acompanhamento das mães infectadas, com diagnóstico precoce e tratamento, se necessário, dos recém-nascidos. Desta forma, a via congênita passou a ser considerada uma das principais formas de infecção pelo *T. cruzi* contribuindo para a instalação da DC em áreas não endêmicas (Gontijo *et al.*, 2009; Bisio *et al.*, 2011).

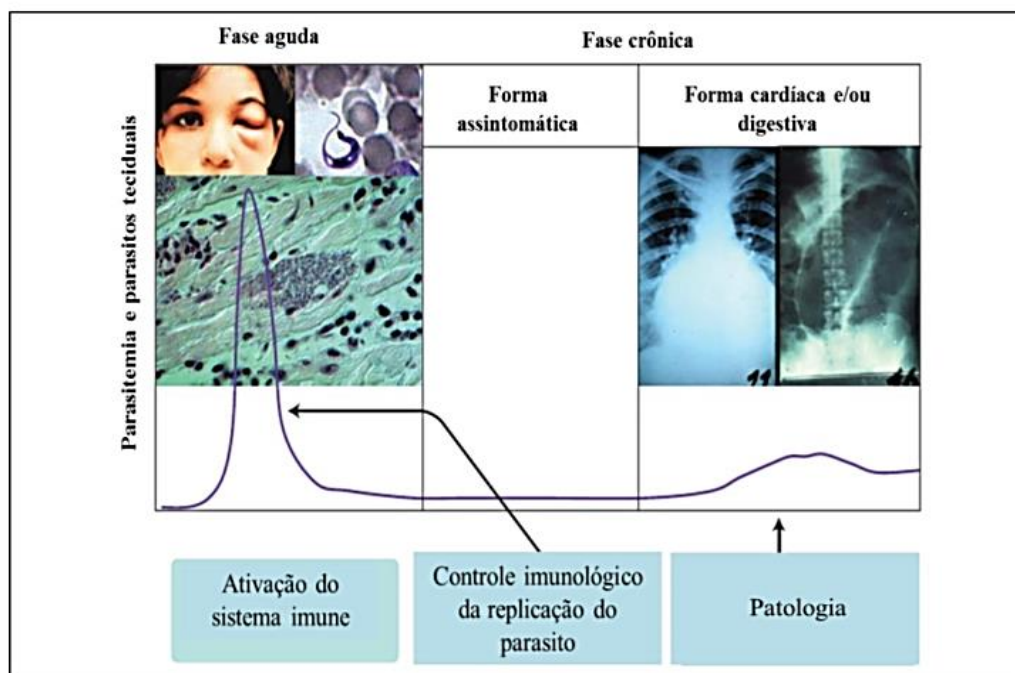
Em menor frequência, a transmissão pode ocorrer através de acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, aleitamento materno (pelo leite, colostro e fissura mamária) e durante a captura do vetor em áreas endêmicas (Rotta *et al.*, 2013; Dias; Neto, 2011). Estudos anteriores sugeriram que a transmissão sexual poderia ser mais uma

via de aquisição do *T. cruzi* (Chagas, 1909; Vianna, 1911). Recentemente, estudos laboratoriais observaram a transmissão sexual em murinos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença (Silva, 2013; Ribeiro *et al.*, 2016).

## **2. Manifestações Clínicas**

### *2.1 Fase aguda*

A infecção pelo *T. cruzi* causa manifestações clínicas variáveis, sendo a fase inicial da infecção denominada de fase aguda. Ela se inicia entre seis a dez dias após o contato com o *T. cruzi* e dura aproximadamente dois meses. Esta fase é caracterizada por grande número de parasitos circulantes no sangue periférico. Também é observado ninhos de amastigotas em diferentes tecidos. Alguns indivíduos apresentam o chagoma de inoculação ou sinal de Romanã, sinalizando a porta de entrada do protozoário, mas na maioria das vezes esta fase é assintomática e passa despercebida (Figura 4). Eventualmente alguns sintomas podem aparecer. Eles são geralmente moderados ou atípicos, como dores no corpo, febre e mal-estar. Às vezes pode ser visto hepatomegalia, esplenomegalia e insuficiência cardíaca (Shikanai-Yasuda; Carvalho, 2012; Andrade *et al.*, 2011; Junqueira *et al.*, 2010). A meningoencefalite, apesar de ser pouco descrita, foi bem documentada pelo próprio Carlos Chagas. As principais manifestações descritas por ele incluíam cefaléia, vômitos, convulsões e rigidez de nuca em quatro (36,4%) dentre onze das crianças de sua casuística que faleceram (Chagas, 1916).



**Figura 4. Curso natural da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.** A figura ilustra as duas fases da doença de Chagas. Primeiramente ocorre a fase aguda, geralmente assintomática, associada com alta parasitemia sanguínea, presença de parasitos nos tecidos e ativação do sistema imunitário. Ilustrada no canto superior esquerdo por uma criança com o sinal de Romaña, pelo tripomastigota no sangue periférico e pelas formas amastigotas nos tecidos. Na fase crônica a parasitemia sanguínea é baixa, a maioria dos pacientes são assintomáticos, apresentam inflamação local e escasso parasitismo nos tecidos afetados. Porém, 20 a 30% podem desenvolver os sintomas. A fase crônica sintomática está representada no canto superior direito, mostrando as formas cardíacas e digestivas (adaptado de Junqueira *et al.*, 2010).

As manifestações de comprometimento cardíaco na fase aguda são principalmente representadas pela miocardite difusa, de maior intensidade quando comparada àquela de outras etiologias. Ela é geralmente acompanhada de pericardite serosa e, raramente, endocardite (Souza *et al.*, 1990). Além disso, há relatos de manifestações de cardite aguda, com dispnéia aos pequenos e médios esforços, palpitações, taquicardia e edema de membros inferiores. Estes quadros variam desde acometimentos leves até formas graves, com relato de óbitos por insuficiência cardíaca refratária (Crescente *et al.*, 1992; Pinto *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994). Em alguns casos é possível observar em exames de raio-X um aumento variável no tamanho do coração. Esse achado é típico após a morte de indivíduo com DC aguda (Teixeira *et al.*, 2006).

Em um estudo com cinco indivíduos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* foi observado aumento do tamanho do coração em todos eles, além de eletrocardiograma anormal. O ecocardiograma mostrou derrame pericárdico em três dos cinco pacientes (Dias *et al.*, 2008). Em outra investigação com 30 pessoas com DC aguda, Díaz *et al.* (2015), observaram ninhos de amastigotas no coração e a presença de infiltrado inflamatório no interstício. Além disso, os autores identificaram que 75% dos pacientes apresentavam taquicardia, 66,6% insuficiência cardíaca e 41,6% derrame pericárdico. Ademais, foi realizado transplante cardíaco em um dos pacientes. Pinto *et al.* em 2001 e 2008 evidenciaram o comprometimento cardíaco resultante da infecção aguda pelo *T. cruzi* mostrando quadros de cardiomiopatia e alterações na condução elétrica do coração. Todos esses resultados confirmam que o acometimento cardíaco está presente também na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

## 2.2 Fase crônica

Após a fase aguda, os pacientes evoluem para fase crônica da doença. Aproximadamente 70% dos pacientes apresentam a forma assintomática durante toda a vida. No entanto, um terço dos indivíduos podem desenvolver sinais clínicos décadas após a infecção (Pereira-Nunes, *et al.*, 2013). Assim, cerca de 20 a 30 anos após a infecção inicial, aproximadamente 30% dos pacientes apresentam sinais clínicos característicos da fase crônica sintomática, como cardiomiopatia ou cardiomegalia, danos no sistema nervoso periférico ou disfunção no trato digestório, podendo levar ao desenvolvimento de megacólon e/ou megaesôfago (OMS, 2017; Duarte *et al.*, 2014). Na fase crônica a parasitemia sanguínea é muito baixa, como ilustrado pela linha roxa na Figura 4.

O acometimento cardíaco na fase crônica está associado a uma importante morbidade e mortalidade, sendo a principal causa de cardiomiopatia não-isquêmica na América Latina. Tem sido sugerido que o processo de miocardite focal de baixa intensidade se inicia durante a forma indeterminada da DC, levando a destruição das fibras cardíacas e a fibrose progressiva. Isso provoca lesões no coração cumulativas, resultando, com o passar do tempo, no quadro de cardiomiopatia dilatada (Simões *et al.*, 2018). A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é bastante complexa e se manifesta de diferentes formas. Ela está associada a insuficiência cardíaca, arritmias graves, complicações tromboembólicas e manifestações anginosas (Pinto, 1985; Simões *et al.*, 2018). No entanto, muitas vezes a primeira manifestação da cardiomiopatia chagásica é a morte súbita (Schmunis, 1991; Mady, 1994). A manifestação clínica da CCC varia bastante de acordo com o grau de lesão

do coração (Prata, 2001). Nos estágios mais avançados da CCC a cardiomegalia está presente, sendo a mais importante manifestação da DC crônica (Ribeiro *et al.*, 2012). Há aumento progressivo não só do ventrículo esquerdo, com consequente deterioração da função sistólica geral, mas também do ventrículo direito e de ambos os átrios (Simões *et al.*, 2018).

Os quadros de insuficiência cardíaca apresentam dilatação biventricular, adelgaçamento das paredes e lesão vorticilar ou aneurisma apical, além de áreas de endocardite mural e trombos cavitários (Köberle, 1968). Com frequência, a maior repercussão clínica se encontra no lado direito do coração (Simões *et al.*, 2000; Marin-Neto *et al.*, 1998). Em exames histológicos é visto miocardite linfocitária difusa, escassos ninhos de amastigotas, fibrose intersticial difusa e atrofia dos miócitos (Rossi, 1991).

Alterações estruturais e funcionais no leito microvascular cardíaco também são observadas, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo, rarefação capilar e vasoespasmos coronarianos. As alterações microvasculares conduzem a isquemia do miocárdio, podendo agravar a miocardite e contribuindo para a patogênese da doença de Chagas (Rossi; Carobez, 1985; Rossi, 1990; Marin-Neto *et al.*, 2007).

### **3. Diagnóstico**

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a OMS, o diagnóstico da DC deve ser apoiado em dados clínicos, epidemiológicos e confirmado pelo diagnóstico laboratorial. Os exames laboratoriais indicados dependem da fase da doença em que o paciente se encontra e podem ser divididos em duas categorias: parasitológicos e sorológicos (OPAS, 2009; OMS, 2018).

O diagnóstico parasitológico da doença de Chagas é baseado na demonstração de parasitos em tecidos e no sangue de indivíduos infectados. Esse tipo de diagnóstico é interessante durante a fase aguda, devido ao grande número de parasitas no sangue periférico, onde é possível detectá-los através da observação em microscópio óptico. As técnicas parasitológicas diretas mais utilizadas são o exame a fresco do sangue, a gota espessa e os métodos de concentração do parasito. Existem também métodos parasitológicos indiretos clássicos como o xenodiagnóstico (utilização de triatomíneos não infectados para se alimentarem do sangue do paciente) e hemocultura (Brener *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2018).

Para o diagnóstico sorológico são utilizados testes imunológicos, uma vez que quase todos os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* desenvolvem anticorpos contra a complexa mistura antigênica do parasito. A fase aguda é caracterizada por apresentar altas taxas de anticorpos IgM anti-*T. cruzi*, enquanto na fase crônica os anticorpos são predominantemente da classe IgG (Dias; Coura, 1997; OMS, 2002).

Os três testes sorológicos amplamente utilizados na fase crônica da DC são: hemaglutinação indireta (IHA), imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). É necessário resultado positivo em pelo menos dois testes para estabelecimento do diagnóstico (MS, 2010; OMS, 2002). Esses testes possuem alta sensibilidade, mas podem apresentar baixa especificidade, com um considerável número de diagnósticos inconclusivos. Quando testes sorológicos são persistentemente inconclusivos, algumas diretrizes recomendam o uso de testes moleculares (Brasil *et al.*, 2010).

Emprega-se a reação de polimerização em cadeia (PCR) como diagnóstico laboratorial complementar. A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade quando respeitados os parâmetros de padronização e controle de qualidade dos reagentes utilizados (Mayta *et al.*, 2019). Assim, através das técnicas de PCR (convencional ou em tempo real) é possível a identificação do parasito em material biológico do paciente, pois os métodos de amplificação de ácido nucléico buscam assinaturas específicas do DNA do *T. cruzi*. Ademais, a carga parasitária pode ser determinada através da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (Hagström *et al.*, 2019).

## **4. Tratamento**

### *4.1 Drogas tripanocidas*

Na década de 70 surgiram dois medicamentos contra as infecções pelo *T. cruzi*, o nifurtimox (3-metil-4-5'-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) e o benznidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida). O nifurtimox, também conhecido como Lampit®, fabricado pela empresa Bayer, pertence à classe de drogas nitrofurano. Este fármaco produz radicais livres que se tornam reativos na presença de oxigênio. O parasita não dispõe de métodos de desintoxicação desses produtos, por isso se torna vulnerável à droga (Dias *et al.*, 2009). A resistência desenvolvida pelas diferentes cepas do



parasito, o desinteresse do laboratório em fabricar este medicamento devido ao baixo lucro resultante e os efeitos colaterais para os pacientes resultaram na não comercialização do nifurtimox desde 1980 em alguns países da América do Sul, incluindo o Brasil (Coura; De Castro, 2002; Sobrinho *et al.*, 2009).

O benznidazol (BNZ) fabricado anteriormente por Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., denominado como Rochagan® e Rodanil®, atualmente é fabricado no Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (Pernambuco, Brasil). A droga produz espécies reativas de oxigênio que danificam o *T. cruzi* e inibem seu crescimento (Sales *et al.*, 2017). Atualmente, o BNZ é o único fármaco disponível e aprovado no Brasil para tratamento de portadores da doença de Chagas. Embora reduza significativamente a carga parasitária na fase aguda, o medicamento nem sempre impede o agravamento da doença na fase crônica (Morillo *et al.*, 2015). Ou seja, ele é considerado uma boa opção para a fase aguda, apresentando menor eficiência na fase crônica.

O tratamento com BNZ pode apresentar efeitos colaterais provocando a descontinuidade do tratamento, fato observado em 10-20% dos casos (Urbina, 2014). Entre os efeitos adversos estão sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, edema, febre, anorexia, perda de peso corporal, linfadenopatia, dor muscular, depressão da medula óssea, trombocitopenia e agranulocitose, polineuropatia, parestesia e polineurites periféricas (Coura; de Castro, 2002; Lamas *et al.*, 2006; de Pontes *et al.*, 2010).

#### 4.2 Reposicionamento de fármacos

Atualmente, o tratamento para a DC baseia-se na monofarmacologia, onde os fármacos utilizados apresentam uma eficácia limitada e efeitos colaterais graves, como descrito acima. A fim de minimizar essas restrições, estudos visando o desenvolvimento ou o isolamento de novos medicamentos, o reposicionamento de fármacos e a polifarmacologia estão sendo realizados (Aguilera *et al.*, 2019).

O reposicionamento de fármacos consiste na utilização de agentes farmacoterapêuticos com perfis conhecidos de atividade e de efeitos colaterais sendo já comercializados para o tratamento de outras doenças. Este é um dos métodos mais utilizados e bem-sucedidos no desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças, em especial as negligenciadas (para revisão, Ribeiro *et al.*, 2020). A estratégia se mostra vantajosa diante do custo elevado e do tempo envolvido no desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que os compostos utilizados no reposicionamento já

possuem perfil toxicológico e farmacocinético investigados quando inseridos na sua indicação terapêutica original (Alberca *et al.*, 2016).

Medicamentos de diversas classes farmacológicas foram testados contra o *T. cruzi* como alternativa para o tratamento da DC. A benidipina, um bloqueador de canais de cálcio indicado para o tratamento de hipertensão e angina e o antibiótico clofazimina foram testados contra o parasito por atuarem inibindo sua principal cisteíno-protease chamada cruzipaina. Estes compostos apresentaram resultados promissores para o tratamento da doença, uma vez que reduziram a carga parasitária no sangue e no tecido muscular esquelético, assim como diminuíram os efeitos inflamatórios da infecção em camundongos infectados pelo *T. cruzi*. No entanto, a associação destes fármacos com a terapia atual ainda precisa ser avaliada (Sbaraglini *et al.*, 2016).

O antidepressivo tricíclico clomipramina aumentou a sobrevivência de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e reduziu a carga parasitária, porém não foi capaz de eliminar completamente o parasito. A clomipramina inibe a tripanotona redutase, uma enzima essencial à vida do parasito (Fauro *et al.*, 2013). Outros fármacos como o antiparasitário triclabendazol, o antifúngico de largo espectro sertaconazol e o agente antidepressivo paroxetina apresentaram inibição da proliferação do *T. cruzi* na forma epimastigota (Alberca *et al.*, 2016).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol/fitoalexino não flavonóide, membro da família viniferina de polímeros, existente na natureza tanto na forma de trans-resveratrol, quanto cis-resveratrol (Nikolova, 2007). Durante a análise de diferentes tipos de vinhos tintos quanto à sua concentração de resveratrol, Siemann; Creasy (1992) indicaram o trans-resveratrol como o composto biologicamente ativo capaz de reduzir lipídios séricos, explicando, assim, um dos meios pelo qual a bebida possui efeito cardioprotetor. O resveratrol é considerado um suplemento alimentar pelas agências de vigilância sanitária, com atividade antioxidante e cardioprotetora. Vilar-Pereira *et al.* (2016) mostraram que ele age positivamente na fase crônica da DC através de mecanismos não tripanocidas. Recentemente, o resveratrol vem mostrando efeitos promissores em uma grande gama de doenças, tendo maior número de estudos pré-clínicos sobre o câncer, desordens metabólicas e doenças cardiovasculares (Cottart; Nivet-antoine; Beaudoux, 2014).

Outras drogas que compõem a estratégia de reposicionamento de fármacos pertencem à classe de inibidores da biossíntese de esteróis, por exemplo, os inibidores da C-14 $\alpha$ -demetilase (CYP51). O bloqueio desta enzima leva à depleção da síntese de ergosterol, um esteroide de membrana que é essencial para a vida do parasito. Além disso,

causa o acúmulo de intermediários tóxicos, sendo letal em organismos unicelulares (Soeiro *et al.*, 2013; Lepescheva *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* e em modelos animais na fase aguda e crônica da DC apresentaram bons resultados, porém em humanos o medicamento não demonstrou a eficácia esperada. Os pacientes tratados tiveram o parasito detectado por testes moleculares e os efeitos do fármaco se restringiram à supressão temporária da doença (Molina *et al.*, 2014).

Outras tentativas de reposicionamento de drogas também não alcançaram os resultados esperados, como o uso da aurofina, um composto derivado do ouro indicado para o tratamento de artrite reumatóide. Este fármaco apresentou capacidade de aumentar a sobrevivência de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, porém não apresentou redução na parasitemia, além de apresentar seletividade reduzida (Da Silva *et al.*, 2016).

#### 4.3 Combinação de fármacos

A combinação de fármacos representa uma importante alternativa para o tratamento da DC. Ela consiste na associação de compostos, resultando na redução das doses, na duração do tratamento, nos efeitos adversos e nos custos. Além disso, provocam uma ação sinérgica de compostos com mecanismos de ação distintos com diminuição da toxicidade e da chance de desenvolvimento a resistência (Andrews *et al.*, 2014).

Dois estudos avaliaram a associação entre itraconazol e BNZ em camundongos. Os resultados mostraram redução de 25% na dose de ambos os fármacos e diminuição na duração do tratamento. Os animais tratados com a combinação apresentaram quantidade menor de lesões no tecido cardíaco e redução de células inflamatórias associadas à fase crônica da doença, quando comparados aos animais tratados com apenas um dos fármacos (Martins *et al.*, 2015).

A associação de BNZ e posaconazol também alcançou resultados positivos em camundongos. Os fármacos administrados combinados aumentaram a sobrevivência dos animais e reduziram a carga parasitária quando comparados com animais que receberam administração isolada dos compostos (De Figueiredo Diniz *et al.*, 2013). Já a associação entre BNZ e clomipramina provocou diminuição de necrose e de lesões no fígado, provavelmente proporcionados pelo efeito protetor nos hepatócitos apresentado pelo antidepressivo (Strauss *et al.*, 2013).

Os inibidores da tripanotomina redutase, algumas vitaminas, inibidores da biossíntese do ergosterol, agentes anti-inflamatórios, fármacos para a disfunção cardíaca,

entre outros, também já foram associados na busca de um novo tratamento para DC (Aguilera *et al.*, 2018).

#### 4.4 Novos fármacos

O desenvolvimento e a validação de novos fármacos compreendem várias etapas e, ainda assim, o sucesso não é garantido. Um avanço recente foi o desenvolvimento de inibidores da enzima do *T. cruzi* cruzaina, podendo, futuramente, contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos (Ferreira *et al.*, 2014). A utilização da proteína do *T. cruzi* P21, envolvida na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica, também pode ser importante no desenvolvimento de novos medicamentos (Teixeira *et al.*, 2015).

Estudos estão sendo realizados com o uso de antifúngicos azólicos na busca de uma nova alternativa no tratamento da DC (Keenan; Chaplin, 2015). Atualmente, pesquisadores desenvolvem uma vacina terapêutica que foi testada em camundongos. Foi observada melhora da função cardíaca nos animais, o que poderia evitar a progressão da doença (Pereira *et al.*, 2015).

### 5. Eritropoietina

Haja visto que não há tratamento realmente eficaz para DC, diversas alternativas são utilizadas na busca deste tratamento, nosso fármaco de escolha foi a eritropoietina (Epo) humana, cuja função principal é induzir a produção de glóbulos vermelhos a partir de progenitores na medula óssea, é um hormônio glicoproteico codificado por um gene único localizado no braço longo do cromossomo 7 (Jelkmann, 2013). Ela é sintetizada nas células epiteliais capilares ao redor dos túbulos renais, inicialmente como um pró-hormônio possuidor de uma seqüência total de 193 aminoácidos, sendo os 27 primeiros expressos apenas para proporcionar a secreção do hormônio, não possuindo relevância na atividade biológica (River; Saugy, 2003; Skibeli *et al.*, 1998). Pouco antes de ser secretada, a Epo é clivada e esses 27 aminoácidos são removidos. Ao entrar na circulação sanguínea, há também a perda do aminoácido arginina na posição carboxiterminal, passando o hormônio então a possuir uma seqüência definitiva de 165 aminoácidos alinhados em uma única cadeia polipeptídica contendo duas ligações dissulfeto intramoleculares e quatro cadeias polissacarídicas independentes, ligadas a resíduos de aminoácidos específicos. As cadeias polissacarídicas constituem cerca de 40% da massa molecular da Epo, sendo de grande importância na função hormonal. De modo a evitar sua rápida depuração hepática, antes

que ela alcance seu alvo fisiológico, a macromolécula possui um sinalizador biológico, constituído de resíduos terminais de ácido siálico, situado em posições estratégicas na cadeia polissacarídica (Choi *et al.*, 1996). Estima-se que a meia-vida da Epo, após lançamento na circulação sanguínea, seja da ordem de seis a oito horas (Adamson, 1996).

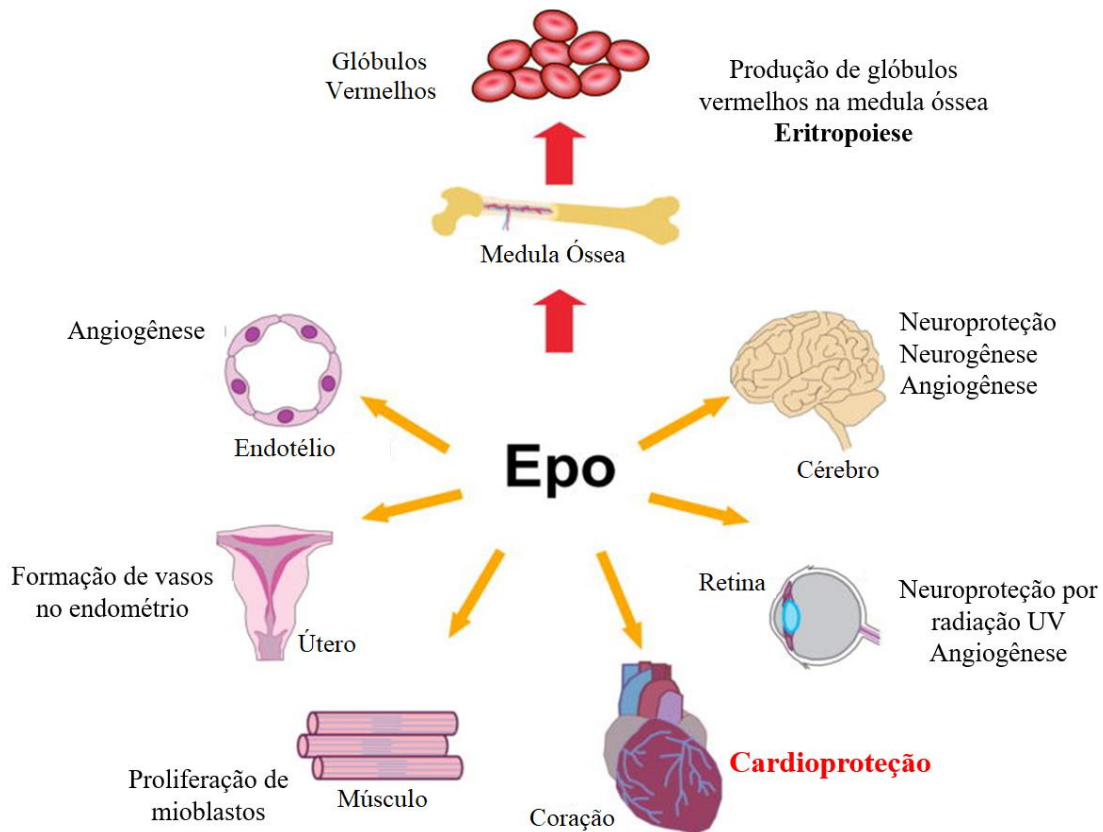
A produção de Epo por células especializadas renais e seu posterior lançamento no sangue ocorrem quando estruturas celulares sensitivas renais percebem redução na taxa de oxigênio circulante ou deficiência na produção eritrocitária, resultando em diminuição da quantidade de eritrócitos circulantes (Alberts *et al.*, 1994; Rassier *et al.*, 1995). As moléculas de Epo produzidas, carregadas pela corrente sanguínea, são conduzidas até a medula óssea onde encontram células progenitoras eritrocitárias. Consta-se que o aumento da taxa de novos eritrócitos circulantes produzidos pela medula se dá em cerca de um a dois dias após o aumento dos níveis de Epo no plasma (Alberts *et al.*, 1994; Oliveira, 2000).

Devido ao curto intervalo de tempo entre o pico de Epo no plasma e o aumento da concentração de novos eritrócitos, conclui-se que ela atua em células precursoras próximas dos eritrócitos maturados e não em células mais primitivas na gênese eritrocitária. Essas células precursoras são denominadas células formadoras de colônia de eritrócitos (CFC-E) e possuem a particularidade de só responderem à Epo. Tais células possuem receptores específicos, pertencentes a uma grande família de receptores para fatores de crescimento hematopoéticos, respondendo a baixíssimas concentrações desse hormônio (Alberts *et al.*, 1994). A Epo, ao se ligar ao seu receptor (EpoR), provoca dimerização na superfície extracelular do mesmo, desencadeando autofosforilação e ativação intracelular de proteínas tirosina quinase (Constantinescu *et al.*, 1999). O estímulo hormonal continua até que o nível de oxigenação tecidual volte a valores normais.

### 5.1 Funções da eritropoietina

A principal função da Epo é a regulação da produção de glóbulos vermelhos (eritropoiese). Entretanto, a observação da sua presença e do EpoR em tecidos não hematopoéticos sugeriu outros efeitos que podem resultar em importantes implicações fisiológicas e clínicas (Maiese *et al.*, 2005). De fato, o EpoR é expresso em cardiomiócitos (Smith *et al.*, 2003; Tramontano *et al.*, 2003), fibroblastos cardíacos (Parsa *et al.*, 2004), células endoteliais (Kertesz *et al.*, 2004), células musculares esqueléticas (Hagström *et al.*, 2010; Launay *et al.*, 2010), células nervosas (Marti, 2004), entre outros (Chateauvieu *et al.*, 2011).

A Epo tem efeito anti-apoptótico e melhora a regeneração tecidual após lesão, tendo ação contrária às citocinas pró-inflamatórias (Nekoui; Blaise, 2017). A atividade protetora da Epo tem sido principalmente estudada no coração e no sistema nervoso. A Figura 5 ilustra diferentes tecidos alvo da Epo e sua ação em cada um deles.



**Figura 5. Tecidos alvo da eritropoietina (Epo)** (adaptado de Zhang *et al.*, 2014).

No miocárdio, foi mostrado que o gene e a proteína da Epo são expressas (El-Hasnaoui-Saadani *et al.*, 2013) e vários estudos demonstraram a cardioproteção conferida pela administração deste hormônio através do seu efeito antiapoptótico, exercendo uma ação anti-hipertrófica e anti-inflamatória e mobilizando as células progenitoras da medula óssea (Latini *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2009). A atividade anti-apoptótica é capaz de normalizar a função hemodinâmica (Moon *et al.*, 2003). A Epo modula o remodelamento cardíaco prejudicial, prevenindo a suscetibilidade a lesões e a disfunção ventricular em corações hipertrofiados (Smith *et al.*, 2009). Além disso, ela demonstrou efeitos benéficos em modelos experimentais de insuficiência cardíaca crônica, por estimulação da angiogênese e neovascularização (Van Der Meer *et al.*, 2005; Westenbrink *et al.*, 2007). Vários estudos em animais forneceram evidências convincentes de que uma única dose de

Epo pode limitar o tamanho do infarto e a remodelação do ventrículo esquerdo (VE) após infarto agudo do miocárdio (IAM) (Moon *et al.*, 2003; Parsa *et al.*, 2003; Prunier *et al.*, 2007).

Assim, diversos estudos com modelos animais mostraram várias ações benéficas da Epo no coração, como a diminuição da perda celular, redução ou inibição da apoptose, prevenção da dilatação do VE, melhora da função do VE, melhora do fluxo coronariano, aumento da densidade capilar, entre outros (Lipsic *et al.*, 2006). Furlani *et al.* (2008) mostraram ainda que a injeção intracardíaca da Epo (em um modelo de IAM) traz benefícios ao coração sem provocar trombose.

## 5.2 Efeitos adversos

A Epo recombinante humana (rHuEpo) vem sendo utilizada em diferentes quadros de anemia, como por exemplo, a anemia devido á insuficiência renal crônica ou á insuficiência cardíaca congestiva e também aquelas presentes nos estágios iniciais de neoplasias ou ainda decorrentes do uso de zidovudina (AZT) em pacientes HIV positivos (Ekblom, 2002; Choi *et al.*, 1996; Mastromarino *et al.*, 2011; River; Saugy, 2003).

Os efeitos adversos da terapia com Epo não são comuns (Bennet, 1991). Quando existem são frequentemente sequelas da doença de base e não necessariamente atribuídos ao tratamento com a Epo. No entanto, apesar de seu efeito cardioprotetor, a Epo pode causar efeitos secundários em pacientes com doenças cardiovasculares pela policitemia e aumento da viscosidade do sangue, provocando hipertensão, infarto do miocárdio, convulsões e hiperativação plaquetária (Ponikowski *et al.*, 2007; Ghali *et al.*, 2008; Mancini *et al.*, 2003). Efeitos colaterais não específicos como problemas músculo-esqueléticos e neurológicos, assim como fadiga, têm sido relatados ocasionalmente (Mastromarino *et al.*, 2011). Esses efeitos colaterais estão frequentemente associados à administração crônica de altas doses de rHuEpo e, portanto, com aumento do hematócrito (Sanchis-Gomar; Lippi, 2011; Sanchis-Gomar *et al.*, 2012).

## II. JUSTIFICATIVA

O progresso em relação ao tratamento das doenças negligenciadas tem melhorado nas últimas décadas com o surgimento de parcerias público-privadas e em função dos avanços nas tecnologias e técnicas de descoberta de novas drogas. No entanto, as atuais terapias para estas doenças nem sempre apresentam alta eficácia, além de possuírem efeitos adversos graves e, dessa forma, é importante estudos que buscam estratégias para o controle dessas enfermidades.

Infelizmente não existem vacinas contra a DC e seu tratamento está limitado, havendo apenas um fármaco comercialmente disponível no Brasil, o BNZ. A utilização de drogas anti-tripanicidas é defendida na fase aguda da doença, pois reduz a parasitemia e melhora o prognóstico de pacientes tratados precocemente (Fernandes *et al.*, 2009; Machado-de-Assis *et al.*, 2013; OMS, 2015). Entretanto, o tratamento medicamentoso não possui resultados satisfatórios em pacientes crônicos, pois além dos efeitos colaterais e contra-indicações, não impede a lesão destrutiva no coração e a morte dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (Guedes *et al.*, 2012; Lauria-Pires *et al.*, 2000). Desta forma, é urgente a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas e de controle para os pacientes com DC, de maneira a impedir ou retardar a evolução das formas clínicas da fase crônica da patologia.

A eritropoietina (Epo) possui efeito cardioprotetor por reduzir os processos de apoptose, inflamação e isquemia do miocárdio através da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Contudo, não se sabe se a ação dessa proteína pode ser utilizada com eficácia tanto na prevenção quanto no combate aos sintomas da cardiomiopatia chagásica. Nesse sentido o presente trabalho justifica-se por avaliar se a Epo possui uma ação terapêutica sobre o coração chagásico murino. Isso, por sua vez, pode representar os primeiros passos no desenvolvimento de um fármaco à base de Epo capaz de prevenir ou tratar com eficiência pacientes chagásicos de todo o mundo. Ademais, independentemente da possível ação cardioprotetora da Epo, os resultados deste experimento trarão avanços na compreensão da patogênese e das características clínicas da cardiomiopatia chagásica.



### **III. OBJETIVO**

#### **1. Objetivo Geral**

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi averiguar o possível efeito cardioprotetor da eritropoietina (Epo) em modelo animal (*Mus musculus*) infectado pelo *T. cruzi*.

#### **2. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos foram:

- Estudar o perfil hematológico de camundongos chagásicos crônicos, tratados ou não com Epo.
- Verificar se há alteração em parâmetros bioquímicos indicadores de lesões cardíacas em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, submetidos ou não ao tratamento com Epo.
- Avaliar a estrutura e o funcionamento cardíaco através de ecocardiograma em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, submetidos ou não ao tratamento com Epo.
- Avaliar a influência do tratamento com Epo na carga parasitária em camundongos infectados pelo *T. cruzi*.
- Analisar os efeitos do tratamento com Epo no coração, baço e intestino grosso de camundongos infectados pelo *T. cruzi* mediante análise histopatológica.

## IV. METODOLOGIA

### 1. Amostragem

Foram utilizados 52 camundongos fêmeas C57BL/6 uniformes quanto ao peso e idade adquiridos no criatório comercial Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Foram mantidos em mini-isoladores em rack ventilado (Alesco Basic) com pressão positiva no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) em condições ambientais padronizadas (temperatura de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade de  $49 \pm 3\%$  com alternância de ciclos dia/noite de 12h), com livre acesso a ração comercial e água. O projeto foi realizado de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UnB (CEUA/UnB) nº150813/2014 (Anexo 1).

#### *1.1 Grupos experimentais*

Os animais foram aleatoriamente divididos em oito grupos experimentais separados em dois grandes grupos:

##### 1. Administração de salina ou Epo na fase aguda da infecção:

1.1. Grupo não infectado com administração de salina de d1 a d30 (grupo controle de B1) (NI\_SFa) (n =7).

1.2. Grupo infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda da doença (de d1 a d30) (I\_SFa) (n =8).

1.3. Grupo não infectado pelo *T. cruzi* e que recebeu Epo de d1 a d30 (NI\_EpoFa) (n =5).

1.4. Grupo infectado pelo *T. cruzi* e tratados com Epo durante a fase aguda da doença (de d1 a d30) (I\_EpoFa) (n =8).

## 2. Administração de salina ou Epo na fase crônica da infecção:

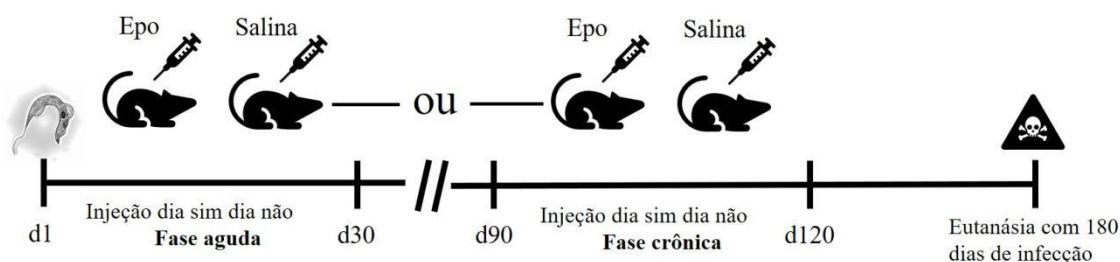
2.1. Grupo não infectado com administração de salina de d90 a d120 (grupo controle de B2) (NI\_SFc) (n =8).

2.2. Grupo infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase crônica da doença (de d90 a d120) (T\_I\_SFc) (n =3).

2.3. Grupo não infectado com administração de Epo de d90 a d120 (NI\_EpoFc) (n =5).

2.4. Grupo infectado pelo *T. cruzi* e tratados com Epo durante a fase crônica da doença (de d90 a d120) (T\_I\_EpoFc) (n = 8).

Todos os animais não tratados com Epo receberam placebo (solução salina) durante o mesmo período do tratamento (Figura 6) (ver capítulo 2 sobre a administração das soluções).



**Figura 6. Desenho experimental do estudo sobre o efeito terapêutico da eritropoietina na doença de Chagas.** d1: dia experimental 1. d30: dia experimental 30. d90: dia experimental 90. d120: dia experimental 120.

## **2. Administração de salina e eritropoietina**

Os animais tratados com Epo receberam 2000 U/kg de Hemax Eritron alfaepoetina (Biosintética Farmacêutica) (não houve conflito de interesse com o laboratório fabricante) por via intraperitoneal (i.p.) de dois em dois dias durante 30 dias. Desta forma, os camundongos infectados pelo *T. cruzi* foram tratados com Epo durante a fase aguda (d1 a d30) ou durante a fase crônica (d90 a d120). Os animais não infectados receberam a Epo nos mesmos períodos.

Solução salina (NaCl 9 mg/mL) foi administrada via i.p. como placebo nos mesmos períodos experimentais dos grupos tratados com Epo. Os animais receberam a solução salina de acordo com o seu peso individual. Para um animal de 20g foi decidido aplicar 150µL de solução salina (volume equivalente em relação à Epo). Desta forma, foi utilizado

regra de três simples para verificar o volume a ser administrada em cada camundongo, em função de seu peso corporal.

### **3. Cultura do *Trypanosoma cruzi* e infecção dos animais**

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Colombiana foram mantidas em cultura de mioblasto murino da linhagem L6, em Meio Mínimo Essencial (DMEM), pH 7.2 acrescidos de Soro Fetal Bovino (SFB) a 5%, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% e à temperatura de 37°C, após duas passagens por camundongos C57BL/6. O número de parasitos no sobrenadante foi contado em câmara de Neubauer e diluído em DMEM para obtenção da concentração de 5 x 10<sup>5</sup> tripomastigotas/mL. Sendo assim, 27 animais dos grupos intitulados infectados foram inoculados por via i.p. com 10<sup>5</sup> parasitos em 0,2 mL de DMEM.

### **4. Confirmação da infecção**

A parasitemia no sangue periférico dos animais infectados foi verificada a partir do 8º dia de infecção através da pesquisa a fresco do *T. cruzi*. Para isso, foi obtida uma gota de sangue pela secção da cauda do camundongo e colocada em lâmina contendo 10µL de anticoagulante (citrato) coberta em seguida com lamínula. A lâmina foi observada ao microscópio óptico, em objetiva de 40X, à procura do parasito segundo metodologia descrita por Brener (1962).

### **5. Análises Hematológicas**

Foi colhido cerca de 0,2 mL de sangue no sinus retro orbital em microtubos capilar heparinizado (heparina sódica) para realização de hemograma completo e testes bioquímicos. Para isso os animais foram anestesiados por via i.p. no quadrante abdominal inferior direito com cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (ambos do fabricante Syntec) na proporção de 2:1 e na dosagem máxima de 10 mL/kg.

O hemograma completo foi realizado no início do período experimental (d0) e imediatamente antes da eutanásia. Foi realizada a contagem total de hemácias (RBC, do inglês *red blood cells*) e leucócitos (WBC, do inglês *white blood cells*) e determinado o

hematócrito (Ht) e a concentração de hemoglobina (HGB). As análises hematológicas foram realizadas com o contador de células automático (ABX Micros ESV 60, Horiba). Para a contagem diferencial leucocitária foram preparados esfregaços de sangue total e os leucócitos foram corados com panótico rápido. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX51 (modelo U-LH100HG), usando a objetiva de 100X.

## **6. Dosagens Bioquímicas**

Foi efetuada a determinação sérica da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase total (CK) e creatina quinase fração miocárdica (CK-MB). As avaliações bioquímicas foram realizadas em diferentes períodos experimentais, sendo realizadas no início do período experimental (d0) e imediatamente antes da eutanásia para todos os grupos. Além disso, com 15 dias e com 90 dias de infecção para os camundongos inoculados com o *T. cruzi* ou em data equivalente para os animais não infectados. A razão CK/AST foi realizada após as dosagens, pois ela é usada no diagnóstico de alterações cardíacas (Dufour, 1988).

Para isso, as amostras de sangue colhidas como descrito anteriormente foram passadas para tubos de microcentrifugação. Após completa coagulação sanguínea a temperatura ambiente, o plasma foi obtido por centrifugação a 10.000 rpm durante 5 min (Centrífuga Micro Hematócrito 24t). Em seguida foi realizada uma diluição do plasma em solução salina estéril (1:3) para obtenção do volume necessário para a realização dos testes. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator da diluição para correção. As dosagens bioquímicas foram realizadas em equipamento automatizado Cobas C-111 (Roche Diagnostics) utilizando kits bioquímicos específicos (Roche) de acordo com recomendações do fabricante.

## **7. Ecocardiograma**

Para avaliação do coração do ponto de vista morfológico e hemodinâmico, a ecocardiografia transtorácica (ETT), método de imagem não invasivo foi realizada no início do período experimental (d0), com 15 e 90 dias de infecção (fase aguda e fase crônica da doença de Chagas) e antes da eutanásia. Os animais não infectados pelo *T. cruzi* tiveram as ETTs realizadas no mesmo período. Os exames foram realizados no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília por um único operador que não tinha conhecimento quanto aos grupos experimentais.

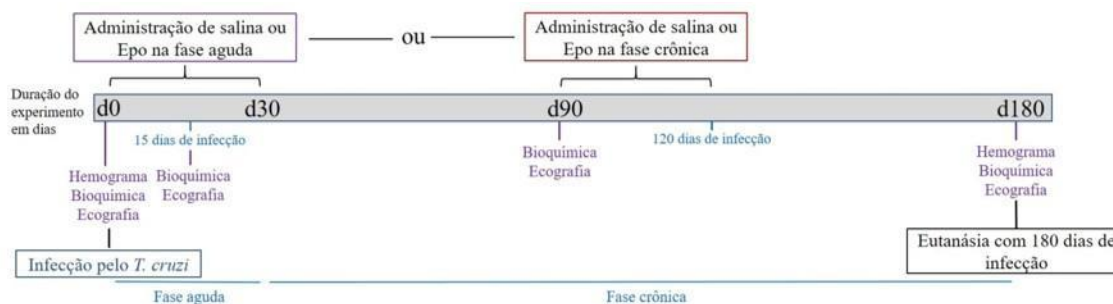
Para a realização das ETTs os animais foram anestesiados conforme protocolo indicado no Capítulo 5 (Análises hematológicas). Em seguida, foi efetuada a tricotomia da face anterior do tórax. Foi aplicado gel de ecocardiografia no tórax raspado e na cabeça do transdutor. O camundongo foi, então, contido por um experimentador e os exames foram realizados com o equipamento Vivid S6 (GE Healthcare), juntamente com transdutor de 11 MHz, sendo os dados registrados no aparelho para realização das medidas e cálculos posteriormente. As modalidades ecocardiográficas avaliadas foram a bidimensional (modo B) e unidimensional (modo M). Pelo menos três séries de dados foram registrados para cada animal. Após gravação, o camundongo foi limpo para retirar o gel.

Por meio de imagens ecocardiográficas obtidas pela janela esternal, entre o quarto e quinto espaços intercostais, em modo-M, eixo transversal, com o cursor direcionado equidistante dos músculos papilares do ventrículo esquerdo no plano cordal, as seguintes variáveis foram analisadas: diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (DIVES) e na diástole (DIVED), espessura da parede livre do ventrículo esquerdo na sístole (PLVES) e na diástole (PLVED), fração de encurtamento (FEt) e a fração de ejeção (FE).

## **8. Coleta de tecidos**

Após 180 dias de infecção (d180) ou período equivalente, os camundongos foram eutanasiados por superdosagem anestésica da mistura cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2%. Em seguida, com auxílio de uma seringa foi colhido sangue por punção cardíaca. O volume de 0,25 mL de sangue foi imediatamente colocado em microtubo de 0,5 ml com EDTA (Vacuplast) para posterior extração de DNA. Em seguida, foi realizada incisão ventral para colheita do coração, baço e intestino grosso. Uma parte dos tecidos foi colocada em formaldeído 4% para os estudos histopatológicos e o restante foi macerado e colocado em 200 µL de tampão de lise (Mini Spin Plus Biopur; Biometrix) para extração de DNA.

A Figura 7 ilustra o desenho experimental do estudo com os diferentes experimentos realizados durante o período experimental.



**Figura 7. Linha temporal com os principais experimentos realizados para os grandes grupos avaliando o possível efeito terapêutico da eritropoietina (Epo).**

## 9. Extração de DNA

### 9.1 Extração de DNA total de *Trypanosoma cruzi*

A extração do DNA de *T. cruzi* foi realizada para elaboração da curva de concentração utilizada para a quantificação absoluta dos parasitos por qPCR nas diferentes amostras. As formas epimastigotas do *T. cruzi* cultivadas em meio LIT foram centrifugadas a 1.500 xg por 15 minutos e o sedimento foi lavado e centrifugado duas vezes com PBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) a 1.500 xg por 15 minutos. Em seguida, foi ressuspenso em tampão de extração na concentração de  $5 \times 10^7$  células/mL de solução e mantido a 37°C. Após 1 hora de reação, foi adicionada Proteinase K na concentração final de 100 µg/mL e incubado por 12 horas a 37°C. Em seguida, foram feitas duas extrações com clorofane e uma com clorofil, respectivamente. Para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto 100% (2,5V) gelado (4°C) e acetato de sódio 3M pH 4,7 (0,1V). Após a precipitação, o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado e depois de totalmente seco foi ressuspenso em tampão TE (TrisHCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0) e armazenado a -20 °C, conforme a descrição de Sambrook e Russel (2001).

### 9.2 Extração de DNA de tecido

O isolamento do DNA do sangue, coração, baço e intestino grosso foi feito com o kit comercial com coluna de membrana de sílica Mini Spin Plus Biopur (Biometrix) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 25 µL de proteinase K e 200 µL de amostra biológica macerada em tampão de lise em um microtubo de centrifugação estéril de 1,5 mL com posterior homogeneização vigorosa em vórtex e incubação a 56°C por 15 min. Após este período foi adicionado 210 µL de etanol (96%-100%) e homogeneizado novamente em vórtex. Em seguida, o material foi transferido para

o tubo Spin S com membrana sílica fornecidos pelo kit e foi centrifugado por um minuto à 14.000 rpm no equipamento Centrifuge 5804 R. Após centrifugação foi descartado o tubo de coleta com o filtrado e colocado o tubo-filtro sob um novo tubo de coleta. Para lavagem da membrana contendo o DNA, primeiramente foi adicionado 500 µL de Tampão de Lavagem SI e centrifugado a 14.000 rpm por um minuto (Centrifuge 5804 R). Foi descartado novamente o tubo de coleta com o filtrado e colocado o tubo-filtro sob um novo tubo de coleta adicionando-se 600 µL do Tampão de Lavagem SII e centrifugado a 14.000 rpm por um minuto novamente na mesma centrífuga. Foi descartado apenas o filtrado, mantendo-se, então, o tubo de coleta. Para garantir a total eliminação do etanol presente nas soluções de lavagem, a amostra foi centrifugada em velocidade máxima por quatro minutos. Por fim, colocou-se o tubo filtro em um tubo de eluição S de 1,5 mL e o DNA foi ressuspensionado em 200 µL de tampão de eluição pré-aquecido à temperatura de 56 °C. Após incubação à TA por um minuto e centrifugação a 14.000 rpm por um minuto, o DNA foi obtido.

### *9.3 Quantificação e análise do DNA extraído*

Após extração, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue PlusSpectrophotometer (GE Healthcare) e a pureza observada através da razão entre as absorvâncias 260/280 nm. O DNA foi armazenado a -20 °C até o momento de sua utilização. Em seguida, para verificar a integridade do DNA e a ausência de inibidores de PCR foi realizado o teste de PCR convencional (cPCR) específico para o gene constitutivo  $\beta$ -actina. Os produtos da cPCR foram analisados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando tampão TAE 1X (Tris acetato 90 mM pH 8,0 e EDTA 25 mM) e posterior observação na luz ultra-violeta.

## **10. Quantificação da carga parasitária**

A qPCR foi realizada para a quantificação absoluta do DNA nuclear (nDNA) do parasito nas amostras de sangue, coração, baço e intestino grosso. Após a elaboração de curva padrão, as amostras dos camundongos foram testadas na qPCR.



### 10.1 Curva padrão

Para identificar o número de ciclos necessários para a detecção da fluorescência com a utilização do sistema de detecção SYBR Green e para determinar a concentração absoluta de uma amostra é necessária uma curva padrão gerada pela relação dos valores de Cq (do inglês, *quantification cycle*) e do logaritmo (log) do número de cópia inicial (os quais são inversamente proporcionais). O Cq é o ciclo a partir do qual a amplificação exponencial alcança uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (referência passiva do aparelho ou *background*). Desta forma, foi elaborada uma curva padrão para a quantificação absoluta do DNA do *T. cruzi* no material biológico dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. Para isso, foi realizada diluição seriada de DNA do *T. cruzi* (1:10) para obtenção de amostras contendo  $10^2$  a  $10^{-3}$  parasitos. Em seguida a qPCR foi realizada com os iniciadores TcZ3 (5' TGC ACT CGG CTG ATC GTT T 3') e TcZ 4 (5'-ATT CCT CCA AGC AGC GGA TA 3'), gerando um produto de aproximadamente 168 pb (Ndao *et al.*, 2000). A curva padrão apresentou eficiência de 97,7%. Ela foi salva e utilizada para a quantificação do parasito através da utilização da equação da reta ( $y = ax+b$ ; onde y é o Cq da amostra; x é a quantidade do produto amplificado a ser calculada; a é o coeficiente angular da reta e b é o coeficiente linear).

### 10.2 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real das amostras

Todas as amplificações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp), em termociclador StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) com os iniciadores TcZ3 e TcZ4 (Ndao *et al.*, 2000). Utilizou-se a seguinte padronização: 100 ng do DNA molde de camundongo, 0,2  $\mu$ M de cada um dos iniciadores e 10  $\mu$ M de Power Up SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 20  $\mu$ L. A seguinte condição de amplificação foi utilizada: estabilização a 50°C por 2 min (devido a presença de dUTP no master mix); desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, anelamento a 60°C por 45 seg, extensão a 72°C por 10 seg. Para a formação da curva de dissociação: 95°C por 15 seg; 60°C por 1 min e 95°C por 15 seg. Em todas as reações foram incluídos dois controles negativos (amostras sem DNA - branco - e amostra de camundongo sabidamente negativa para *T. cruzi*), além de vários pontos da curva de quantificação (amostras de *T. cruzi* com diferentes concentrações).

## 11. Análise Histopatológica

Parte dos órgãos coletados (coração, baço e intestino grosso) foram fixados em formaldeído (4%) e cortamos em micrótomo em secções de 5 µm de espessura. Em seguida foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e as lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX51 (modelo U-LH100HG), usando a objetiva de 40X.

A avaliação da resposta tecidual foi baseada em análises qualitativas e semi-quantitativas dos tecidos infectados e não infectados pelo *T. cruzi*, tratados ou não com Epo. Para isso, a necrose de cardiomiócitos, o infiltrado mononuclear perivascular multifocal, o infiltrado mononuclear intersticial multifocal e a fibrose (depósito de colágeno intersticial) cardíacos; a hiperplasia de folículos esplênicos e o infiltrado inflamatório mononuclear multifocal no intestino foram classificados semiquantitativamente em: 0 (ausente), 1 (leve – 2 a 15% de toda a secção), 2 (moderado – 20 a 60% de toda a secção) e 3 (severo – acima de 70% da secção). Também foi avaliado a presença ou ausência de ninhos de amastigotas no tecido cardíaco, com a seguinte classificação: 0 (ausente), 1 (raro – um ninho de amastigota observado em duas secções), 2 (moderado (2 a 10 ninhos) e 3 abundante (mais de 10 ninhos) (modificado de Castro-Sesquen *et al.*, 2011 ).

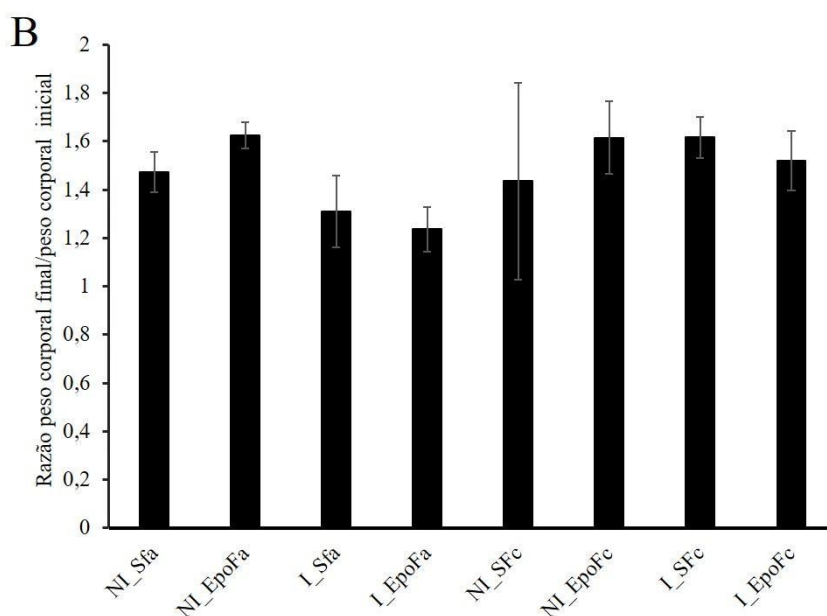
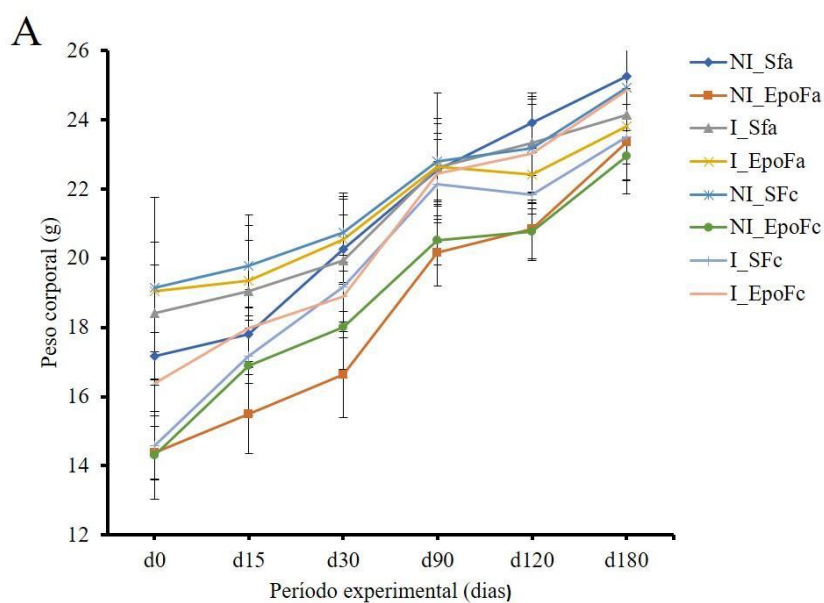
## 12. Análise Estatística

O delineamento experimental foi realizado em esquema fatorial (2 x 2 x 2), composto por 16 tratamentos relacionados às combinações das seguintes variáveis: infecção (sim ou não), substâncias (solução salina ou Epo) e tempo de infecção (aguda ou crônica). Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa SAS (v 9.3, Cary, Carolina do Norte). Os dados foram avaliados quanto à normalidade usando o teste Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram testados quanto às diferenças entre os grupos usando o PROC NPAR1WAY e o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. As variáveis que apresentaram diferenças entre os grupos no teste de Kruskal-Wallis foram então submetidas ao teste de Wilcoxon.

## V. RESULTADOS

### 1. Peso Corporal

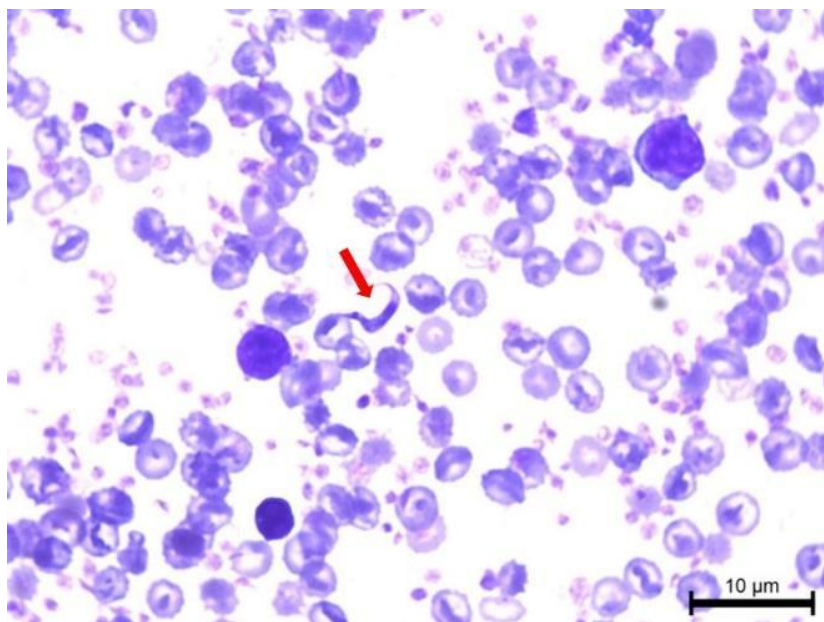
A Figura 8 mostra o ganho de peso corporal dos diferentes grupos ao longo do período experimental expresso em valor absoluto e relativo (razão peso corporal final/peso corporal inicial). Este último apresentou uma interação significativa entre infecção e substância ( $p = 0,001$ ), com os animais não infectados (NI) tratados com Epo apresentando valores mais altos tanto em comparação com os animais NI que receberam salina, quanto em relação aos infectados (I) e tratados com Epo ( $1,62 \pm 0,11$ ;  $1,40 \pm 0,21$  e  $1,40 \pm 0,17$ , respectivamente). Houve também uma interação significativa entre infecção e período de tratamento ( $p = 0,0002$ ) com os camundongos NI e tratados (com salina ou Epo) na fase aguda apresentando maior ganho de peso que os I e tratados no mesmo período ( $1,54 \pm 0,11$  e  $1,29 \pm 0,12$ , respectivamente). Por sua vez, estes últimos tiveram a razão peso corporal final/peso corporal inicial menor quando comparados aos camundongos I e NI tratados na fase crônica ( $1,29 \pm 0,12$ ;  $1,55 \pm 0,12$ , e  $1,44 \pm 0,26$ , respectivamente).



**Figura 8. (A) Ganho de peso absoluto ao longo do período experimental. (B) Ganho de peso relativo (razão peso corporal final/peso corporal inicial).** NI\_SFa: grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). NI\_EpoFa: não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa: infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa: infectado tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). NI\_SFc: não infectado com administração de salina na fase crônica (d90 a d120). NI\_EpoFc: não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc: infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc: infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120).

## 2. Confirmação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A confirmação da infecção pelo *T. cruzi* foi realizada por exame a fresco do sangue periférico dos animais. Essa análise confirmou a presença de formas tripomastigotas na circulação de todos os camundongos inoculados com  $10^5$  parasitos pela via intraperitoneal. A Figura 9 ilustra uma lâmina com extensão de sangue periférico de um animal infectado corada com panótico rápido, sendo possível a observação do parasito.



**Figura 9.** Forma tripomastigota visualizada em esfregaço sanguíneo com sangue periférico de animal infectado pelo *T. cruzi* corado com hematoxilina-eosina. A seta vermelha indica o parasito (Barra: 10 µm).

## 3. Hematócrito

Imediatamente antes da administração de salina ou Epo, o hematócrito (Ht) não apresentou diferença significativa entre os diferentes grupos. Como esperado, a administração de Epo induziu a policitemia. O volume dos glóbulos vermelhos após 30 dias de tratamento foi em média 42% mais elevado. A análise estatística dos valores de Ht entre todos os grupos mostrou uma interação significativa entre infecção e substância (Epo ou salina) ( $p = 0,0003$ ), mostrando o efeito positivo do Epo e da infecção no volume dos glóbulos vermelhos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Avaliação da influência da administração de eritropoietina no hematócrito dos diferentes grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Hematócrito (%)	
	Antes	Depois
NI_SFa	45,50 ± 3,01	46,66 ± 1,21
NI_EpoFa	45,75 ± 2,87	62,8 ± 1,92*
I_SFa	45,50 ± 3,08	43,57 ± 1,98
I_EpoFa	44,00 ± 2,00	63,00 ± 2,00*
NI_SFc	46,00 ± 3,00	47,00 ± 1,00
NI_EpoFc	46,40 ± 1,14	62,60 ± 1,67*
I_SFc	45,33 ± 2,30	46,33 ± 1,52
I_EpoFc	44,85 ± 1,06	66,75 ± 1,75*

Valores em média ± desvio-padrão.

\*O asterisco indica diferença estatística na linha ( $p < 0,05$  ou menor).

NI\_SFa: grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). NI\_EpoFa: não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa: infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa: infectado tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). NI\_SFc: não infectado com administração de salina na fase crônica (d90 a d120). NI\_EpoFc: não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc: infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc: infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120).

#### 4. Avaliação Hematológica

O hemograma completo foi realizado no início do experimento (d0) e no momento da eutanásia (d180). Na série vermelha foram avaliados três parâmetros: volume globular ou hematócrito (Ht), hemácias (RBC) e hemoglobina (HGB) (Tabela 2). Em d180 os dados de Ht não puderam ser obtidos para os grupos NI\_EpoFc e I\_SFc. No início do período experimental não havia diferença significativa no Ht. Ao final do experimento algumas diferenças puderam ser observadas ( $p = 0,001$ ). A destacar os grupos NI\_SFa e I\_SFa que apresentaram uma redução significativa do Ht no final do período experimental ( $45,67 \pm 2,88$  % no d0 e  $35,50 \pm 4,50$  % no d18;  $p = 0,01$  para o primeiro e  $46,00 \pm 3,22$  % no d0 e  $40,57 \pm 5,13$  no d180;  $p = 0,05$  para o segundo). Desta forma, no d180 o Htc destes dois grupos não apresentou diferença estatística entre si, mas foram significativamente diferentes dos outros grupos, exceto para os valores de I\_SFa e NI\_SFc. Os resultados mostram que um mês após o tratamento com a Epo o Ht retorna aos valores de repouso. Além disso, a infecção parece não modificar o volume de hemácias no sangue.

Os camundongos do grupo NI\_EpoFa foram os que apresentaram menor número de RBC no início do período experimental (d0). Esse número foi significativamente mais

baixo em relação aos grupos I\_SFa e I\_EpoFa ( $p = 0,01$ ) (Tabela 2). No final do período experimental o grupo I\_EpoFc apresentou valores mais elevados que NI\_SFa, NI\_SFc e NI\_EpoFc ( $p = 0,04$ ).

Em relação a concentração de HGB ela variou de 9,08 a 18,65 % no d0, apresentando diferença significativa entre alguns grupos ( $p = 0,0001$ ). Em contrapartida, no d180 os valores foram semelhantes entre os diferentes grupos com média geral de 12,33%. As análises entre os animais dos mesmos grupos comparando d0 com d180 mostrou que nos grupos NI\_SFa, I\_SFa e I\_EpoFa houve uma diminuição significativa na HGB no final do experimento (valores de  $p = 0,009$ ;  $0,02$  e  $0,005$ , respectivamente). Por outro lado, no grupo NI\_EpoFc o HGB aumentou em d180 comparado a d0 ( $p = 0,02$ ) (Tabela 2)

**Tabela 2.** Parâmetros hematológicos da série vermelha no início e no final do período experimental.

Valores de referência*	Ht (%)		RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		HGB (g/dL)	
	35 a 52		7 a 11		10 a 17	
	d0	d180	d0	d180	d0	d180
NI_SFa	45,67 $\pm$ 2,88	35,50 $\pm$ 4,50a	10,62 $\pm$ 1,96b	7,11 $\pm$ 1,58a	18,65 $\pm$ 3,42c	11,65 $\pm$ 1,48
NI_EpoFa	45,75 $\pm$ 2,87	48,00 $\pm$ 3,16b	6,80 $\pm$ 1,36a	7,72 $\pm$ 0,78a,b	9,73 $\pm$ 0,67a	12,85 $\pm$ 0,64
I_SFa	46,00 $\pm$ 3,22	40,57 $\pm$ 5,13a	9,14 $\pm$ 0,31b	8,33 $\pm$ 0,80a,b	15,60 $\pm$ 0,72a,b	11,27 $\pm$ 1,48
I_EpoFa	49,14 $\pm$ 1,77	47,00 $\pm$ 3,06b	9,45 $\pm$ 0,49b	8,53 $\pm$ 0,66a,b	15,74 $\pm$ 0,40a,b	12,39 $\pm$ 1,03
NI_SFc	47,43 $\pm$ 3,46	44,50 $\pm$ 5,35b	9,48 $\pm$ 1,86a,b	7,76 $\pm$ 0,93a	14,87 $\pm$ 3,05b	11,48 $\pm$ 1,53
NI_EpoFc	47,80 $\pm$ 0,45	---	8,56 $\pm$ 1,93a	7,44 $\pm$ 1,34a	9,20 $\pm$ 0,77a	13,00 $\pm$ 0,47
I_SFc	47,40 $\pm$ 1,95	---	7,84 $\pm$ 1,22a	6,40a,b	9,08 $\pm$ 1,10a	13,20
I_EpoFc	46,71 $\pm$ 2,41	45,71 $\pm$ 0,76b	8,84 $\pm$ 0,88a	9,34 $\pm$ 0,84b	14,03 $\pm$ 1,43b	12,76 $\pm$ 1,97

\*Segundo Weiss & Wardrop, 2010.

Valores em média  $\pm$  desvio-padrão.

Na mesma coluna, letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$  ou menos).

Ht: hematócrito; RBC: hemácias; HGB: concentração em hemoglobina; NI\_SFa: grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). NI\_EpoFa: não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa: infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa: infectado tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). NI\_SFc: não infectado com administração de salina na fase crônica (d90 a d120). NI\_EpoFc: não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc: infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc: infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120).

Também foi realizada a contagem diferencial de leucócitos (WBC) que constitui na quantificação absoluta destas células e a contagem absoluta e relativa de suas subpopulações (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos e bastonetes). No d0 e no d180 foi observado diferença no número dos WBC ( $p = 0,005$  e  $< 0,0001$ , respectivamente), enquanto a contagem das subpopulações foi idêntica nos diferentes grupos experimentais (Tabela 3). No d0 os grupos NI\_SFa e I\_SFa apresentaram alto número de WBC quando comparados aos outros grupos. Em contrapartida, ambos os grupos tiveram um decréscimo significativo em seus WBCs no final do experimento ( $10,50 \pm 1,84 \times 10^3/\text{mm}^3$  no d0 e  $2,08 \pm 0,81 \times 10^3/\text{mm}^3$  no d180;  $p = 0,009$  no NI\_SFa e  $11,90$

$\pm 2,10 \times 10^3/\text{mm}^3$  em d0 e  $6,67 \pm 2,01 \times 10^3/\text{mm}^3$  em d180;  $p = 0,02$  no I\_SF<sub>a</sub>). Em d180 número de WBC dos camundongos NI\_SF<sub>a</sub> foi significativamente menor em relação aos grupos I\_SF<sub>a</sub>, I\_EpoFa e I\_EpoFc ( $p < 0,0001$ ). Em contrapartida, em d180 os WBC foram encontrados em quantidades mais elevadas nos animais do grupo I\_SF<sub>a</sub> em relação ao NI\_SF<sub>c</sub> e NI\_EpoFc ( $p < 0,0001$ ). Em geral, as subpopulações de WBC s não variou muito entre o início e o final do período experimental (d0 e d180) em cada um dos grupos.



**Tabela 3.** Avaliação da série branca com contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos e bastonetes).

		Valores de referência*	NI_SFa	NI_EpoFa	I_SFa	I_EpoFa	NI_SFc	NI_EpoFc	I_SFc	I_EpoFc
<b>Leucócitos</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	2 a 10	<b>d0</b>	10,50	4,95	11,90	6,54	4,30	4,34	3,76	5,30
		<b>d180</b>	±1,84c	±1,21a	±2,10c	±1,53b	±1,14a	±1,09a	±0,44a	±2,79a
<b>Linfócitos (%)</b>	70 a 80	<b>d0</b>	2,08	5,75	6,67	6,24	6,40	2,66	4,00a	6,33
		<b>d180</b>	±0,81a	±1,20a	±2,01b	±1,96b	±10,81a	±0,47a	4,00a	±3,20b
<b>Monócitos</b> (%)	0 a 2	<b>d0</b>	84,33	65,00	79,50	86,43	83,67	85,20	79,25	80,67 ±4,22
		<b>d180</b>	±4,97	±32,76	±4,95	±5,71	±3,21	±3,63	±4,57	69,00
<b>Neutrófilos</b> <b>Segmentados (%)</b>	20 a 30	<b>d0</b>	3,00	23,25	3,00	3,00	2,33	3,20	3,25	2,83
		<b>d180</b>	±1,26	±39,19	±2,83	±2,08	±1,53	±1,92	±1,71	±1,72
<b>Eosinófilos (%)</b>	0 a 7	<b>d0</b>	9,60	2,50	13,50	8,43	8,63	6,00	16,00	20,60 ±32,68
		<b>d180</b>	±7,44	±2,12	±3,11	±2,23	±6,65	±5,15	16,00	20,60 ±32,68
<b>Basófilos (%)</b>	0 a 1	<b>d0</b>	12,33	11,00	17,50	9,43	13,33	10,80	17,25	16,17 ±3,54b
		<b>d180</b>	±4,63a	±6,68a	±2,12b	±4,12a	±3,51a	±1,64a,c	±4,03b	15,00
<b>Bastonetes (%)</b>	Raros	<b>d0</b>	0,33	0,50	0	1,14	0,67	0,60	0,25	0,17
		<b>d180</b>	±0,52	±1,00	11,00	±1,21	±0,58	±0,55	±0,50	±0,41
<b>Basófilos (%)</b>	0 a 1	<b>d0</b>	1,40	0	11,00	0,86	1,13	0	0	0,60
		<b>d180</b>	±1,34	0	±20,67	±0,90	±1,13	0	0	±0,55
<b>Bastonetes (%)</b>	Raros	<b>d0</b>	0	0	0	0	0	0,20	0	0
		<b>d180</b>	0	0	0	0	0	±0,45	0	0
<b>Bastonetes (%)</b>	Raros	<b>d0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
		<b>d180</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

\*Segundo Weiss & Wardrop, 2010.

Valores em média ± desvio-padrão.

Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença estatística (p <0,05 ou menos).

NI\_SFa: grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). NI\_EpoFa: não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa: infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa: infectado tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). NI\_SFc: não infectado com administração de salina na fase crônica (d90 a d120). NI\_EpoFc: não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc: infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc: infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d1120)

## 5. Avaliação Bioquímica

Amostras sanguíneas também foram utilizadas para dosagens bioquímicas para determinação sérica da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase total (CK) e creatina quinase fração miocárdica (CK-MB) em diferentes períodos experimentais (no início e no final, uma vez na fase aguda e outra na fase crônica da infecção e em períodos equivalentes para os animais não infectados). O objetivo foi avaliar os danos na célula cardíaca, pois essas enzimas são encontradas no soro sanguíneo em caso de lesão da membrana celular.

### 5.1. Aspartato aminotransferase

Foi observada uma interação significativa entre a infecção e o dia experimental na dosagem de AST ( $p < 0,0001$ ). No início do estudo (d0), o nível de AST foi similar entre os grupos. Diferença foi vista tanto no d0, quanto no d15, dos animais NI comparados com o d15, d90 e d180 dos animais I (Tabela 4). No grupo dos camundongos I, d0 foi diferente de d15, d90 e d180 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Efeito da interação entre infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e período experimental na atividade da enzima aspartato aminotransferase (U/L).

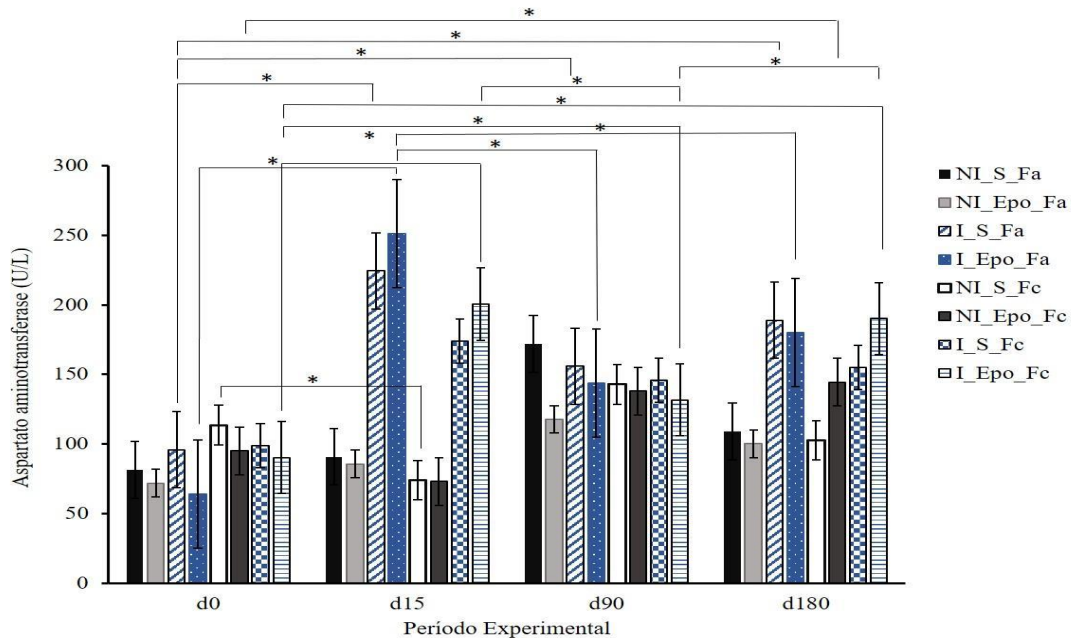
	Não infectados	Infectados
<b>d0</b>	95.70 ±39.33a	84.41 ±29.15a
<b>d15</b>	81.25 ±25.28a	219.00 ±66.68c
<b>d90</b>	146.48 ±109.29b	151.68 ±61,22c
<b>d180</b>	114.79 ±51.61b	182.76 ±52.98c

Dados em média ± desvio padrão.

Valores que não dividem a mesma letra são significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ).

Observando de maneira individualizada cada um dos grupos ao longo do período experimental, foi possível verificar que, na ausência de infecção pelo *T. cruzi*, os níveis séricos de AST permaneceram os mesmos ao longo do tempo, independentemente do tratamento com Epo, exceto nos grupos NI\_SFc e NI\_EpoFc nos quais uma diminuição significativa foi encontrada no d15 ( $p < 0,05$ ).

A atividade da AST teve comportamento semelhante nos grupos infectados, sem efeito do tratamento com Epo (Figura 10). A seguinte tendência foi observada: valores de  $d0 < d90 < 180 < d15$ .

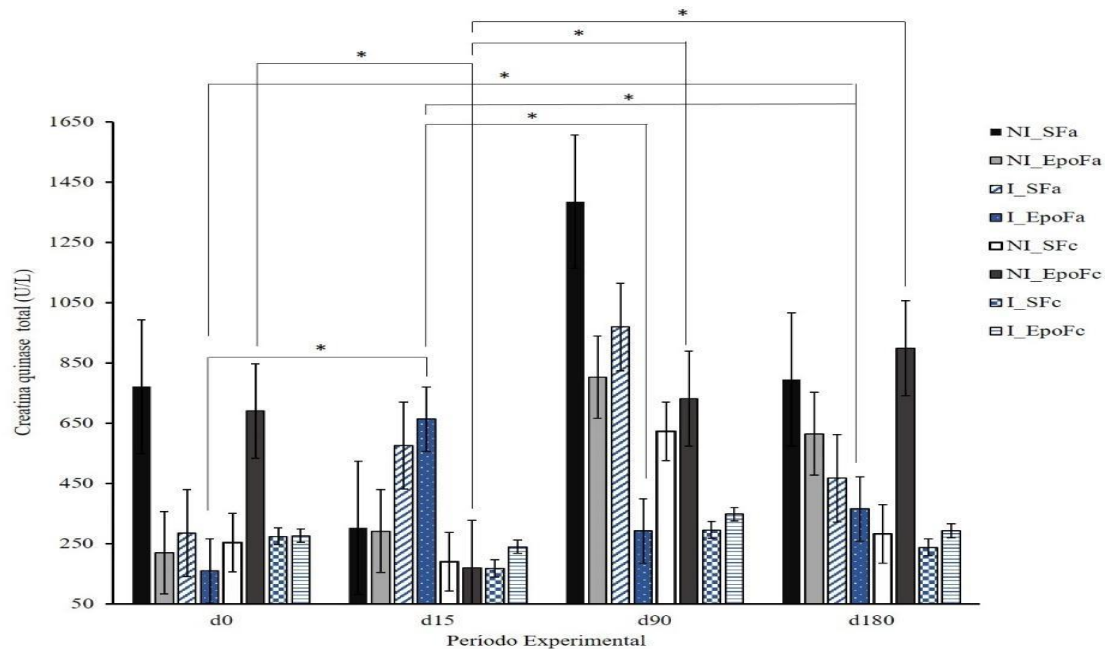


**Figura 10. Níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) nos diferentes grupos experimentais.** NI\_SFa (preto): grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina de d1 a d30. NI\_EpoFa (cinza claro): não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa (padrão listrado azul): infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa (azul): infectado tratado com Epo na fase aguda. NI\_SFc (branco): não infectado com administração de salina de d90 a d120. NI\_EpoFc (cinza escuro): não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc (padrão quadriculado azul): infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc (listas horizontais azuis): infectado tratado com Epo na fase crônica. \*Diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 5.2. Creatina quinase total

Os valores de CK variaram bastante entre os grupos e entre os diferentes dias experimentais em que ela foi dosada. Houve um efeito significativo do dia experimental ( $p = 0,032$ ) nos níveis de CK. Assim, maiores quantidades de CK foram dosadas em d90 comparado ao d15 em todos os grupos, com exceção do I\_EpoFa. Neste, a atividade sérica da CK em d15 foi significativamente maior comparada aos outros dias em que a

medida foi realizada ( $p = 0,004$ ) (Figura 13). Além disso, neste mesmo grupo os níveis de CK no d180 aumentou significativamente comparado ao d0 ( $p = 0,004$ ). No grupo NI\_EpoFc, a CK no d15 foi significativamente menor que nos outros períodos ( $p = 0,023$ ) (Figura 11).



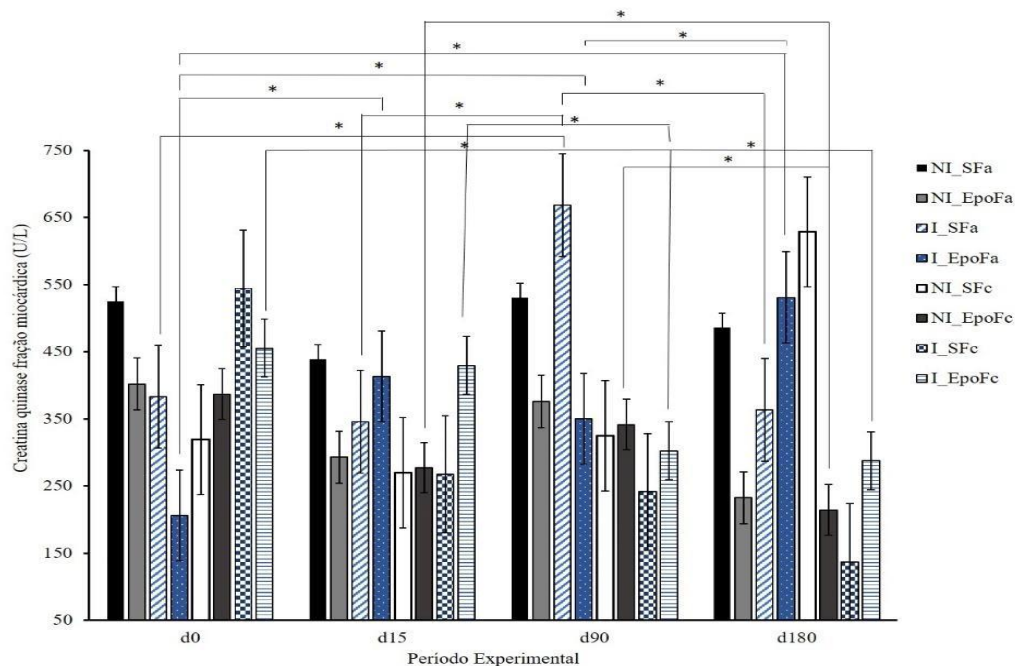
**Figura 11. Níveis séricos de creatina quinase total (CK) nos diferentes grupos experimentais.** NI\_SFa (preto): grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina de d1 a d30. NI\_EpoFa (cinza claro): não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa (padrão listrado azul): infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa (azul): infectado tratado com Epo na fase aguda. NI\_SFc (branco): não infectado com administração de salina de d90 a d120. NI\_EpoFc (cinza escuro): não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc (padrão quadriculado azul): infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc (listas horizontais azuis): infectado tratado com Epo na fase crônica. \*Diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Creatina quinase fração miocárdica

Os resultados mostraram que os animais tratados com Epo tiveram valores significativamente menores de CK-MB ( $p = 0,0008$ ). Diferenças foram observadas na interação entre infecção, substância e dia experimental, mostrando que nos grupos NI\_Epo no d15 os níveis da enzima foram menores que NI\_S em d180 ( $285,27 \pm 83,81$

e  $557,42 \pm 116,16$  U/L, respectivamente); o mesmo foi observado comparando os grupos NI\_Epo no d180 com NI\_S no mesmo período ( $223,63 \pm 53,04$  e  $557,36 \pm 116,16$  U/L, respectivamente) e I\_Epo no d90 em relação aos NI\_S no d180 ( $326,32 \pm 187,81$  e  $557,36 \pm 116,16$  U/L, respectivamente). Provavelmente devido ao grande desvio-padrão entre as amostras do mesmo grupo, os níveis de CK-MB foram maiores nos grupos NI\_S no d180 comparado aos I\_S no mesmo período ( $557,36 \pm 116,16$  e  $325,46 \pm 344,75$  U/L, respectivamente).

A comparação dos níveis enzimáticos dentro do mesmo grupo ao longo do período experimental mostrou que no grupo I\_SFa a CK-MB aumentou em d90, mas em d180 retornou aos valores observados em d0 e d15 ( $p = 0,048$ ) (Figura 12). Surpreendentemente, em NI\_EpoFa e NI\_SFc, o valor de CKMB foi maior em d180 em comparação com os outros períodos experimentais ( $p = 0,007$  e  $0,035$ , respectivamente) (Figura 12). Em I\_EpoFc, os valores de CKMB diminuíram com o tempo ( $p = 0,046$ ) (Figura 12).



**Figura 12. Níveis séricos de creatina quinase fração miocárdica (CK-MB) nos diferentes grupos experimentais.** NI\_SFa (preto): grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina de d1 a d30. NI\_EpoFa (cinza claro): não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa (padrão listrado azul): infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa (azul): infectado tratado com Epo na fase aguda. NI\_SFc (branco): não infectado com administração de salina de d90 a d120. NI\_EpoFc (cinza escuro): não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc (padrão quadriculado azul): infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc (listas horizontais azuis): infectado tratado com Epo na fase crônica. \*Diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 6. Parâmetros ecográficos

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi estimada através da fração de ejeção (FE) e da fração de encurtamento (FET). Não foi observada diferença estatística na FE mensurada ao longo do período experimental em cada um dos grupos, exceto para o I\_Epo\_Fa que apresentou maiores valores no d15 quando comparado ao d180 ( $77\% \pm 15,92$  e  $44,71\% \pm 17,89$ , respectivamente) ( $p = 0,03$ ). Ou seja, a FE foi maior durante a fase aguda da infecção, período no qual os animais foram tratados com Epo. A Tabela 5 classifica os animais no d180 de acordo com o grau de comprometimento cardíaco em função da FE. Sessenta por cento ou mais dos animais de cada um dos grupos NI,

tratado ou não com Epo, apresentaram ausência de disfunção sistólica (FE >55%). No grupo I\_EpoFc, 100% dos camundongos apresentaram FE normal. Em contrapartida, no grupo I\_EpoFa, 28,6% apresentaram FE normal, 42,8% disfunção sistólica leve e 28,6% grave.

**Tabela 5.** Grau de comprometimento cardíaco utilizando como parâmetro a fração de ejeção do ventrículo esquerdo no final do período experimental.

Grupos experimentais	Comprometimento cardíaco				N amostral total
	Ausência	Leve	Moderada	Grave	
	FE >55%	FE de 41 a 55%	FE de 30 a 40%	FE <30%	
NI_SFa	71,43% (5)	14,29% (1)	0%	14,29% (1)	7
I_SFa	57,14% (4)	28,57% (2)	0%	14,29% (1)	7
NI_EpoFa	100% (5)	0%	0%	0%	5
I_EpoFa	28,57% (2)	42,86% (3)	0%	28,57% (2)	7
NI_SFc	75% (6)	25% (2)	0%	0%	8
I_SFc	66,67% (2)	33,33% (1)	0%	0%	3
NI_EpoFc	60% (3)	40% (2)	0%	0%	5
I_EpoFc	100% (8)	0%	0%	0%	8
<b>Total</b>	<b>70% (35)</b>	<b>22% (11)</b>	<b>0%</b>	<b>8% (4)</b>	<b>50</b>

NI\_SFa: grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). NI\_EpoFa: não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa: infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa: infectado tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). NI\_SFc: não infectado com administração de salina na fase crônica (d90 a d120). NI\_EpoFc: não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc: infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc: infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120).

Em relação a FE<sub>t</sub>, foi encontrado uma interação significativa entre infecção e substância no d90 (p= 0,035). Os camundongos NI tratados com Epo apresentaram FE<sub>t</sub> maiores que os I tratados com a mesma substância (39,90 ±8,85 e 28,13 ±10,26, respectivamente). Valores menores de FE<sub>t</sub> também foram observados nos animais I tratados com Epo em comparação aos I que receberam salina (28,13 ±10,26 e 42,11 ±11,16, respectivamente), sugerindo que a Epo não melhora este parâmetro. Entretanto, os animais NI que receberam salina apresentaram FE<sub>t</sub> menor que aqueles I que também receberam salina (30,64 ±11,78 e 42,11 ±11,16, respectivamente). A análise da FE<sub>t</sub> em cada um dos grupos mostrou diferença apenas no I\_EpoFa que apresentou uma redução significativa entre o d15 e o d180 (p = 0,023) (42,15 ±15,18 e 19,57 ±8,96, respectivamente). Ou seja, neste grupo houve uma deterioração da capacidade sistólica

do VE (indicada pelo FE e FEt) com o passar da infecção (fase crônica) e após o tratamento com a Epo (realizado na fase aguda).

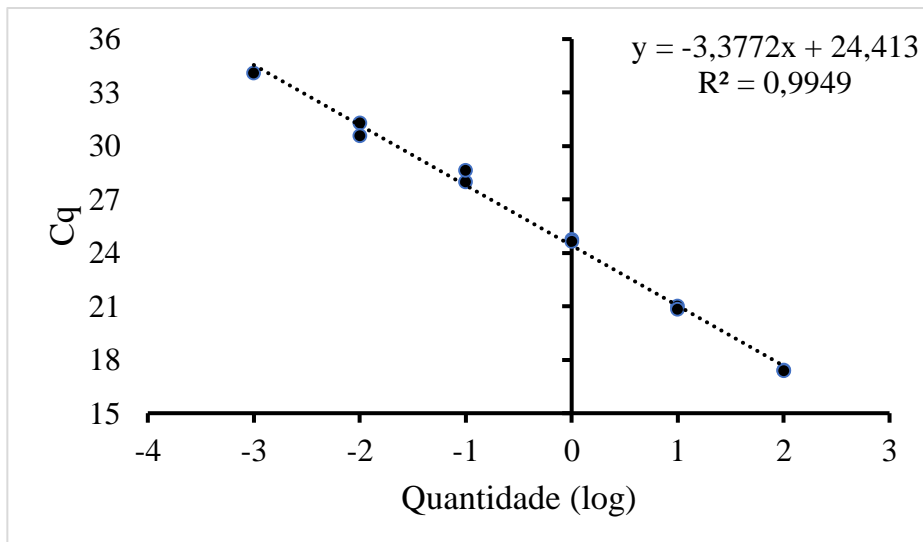
O diâmetro diastólico do VE (DIVED) fornece uma ideia global da função ventricular. No d90 houve uma interação significativa entre infecção, substância e período ( $p = 0,049$ ) evidenciando um aumento nos animais I tratados com Epo na fase crônica em comparação aos NI tratados com Epo no mesmo período ( $2,2 \pm 0,45$  e  $3,2 \pm 0,86$ ). A avaliação deste parâmetro em cada um dos grupos indicou diferenças no NI\_Epo\_Fc ( $p = 0,001$ ) sendo observado a seguinte cinética no DIVED: aumento significativo com 15 dias de infecção (d15), retorno aos valores observados em d0 com 90 dias de infecção (d90) e novo aumento significativo com 120 dias de infecção (d180). As medidas do DIVED foram as seguintes 2,0 mm em todos os animais do grupo no d0;  $3,2 \text{ mm} \pm 0,86$  no d15);  $2,2 \text{ mm} \pm 0,45$  no d90 e  $3,2 \text{ mm} \pm 0,84$  no d180. Um aumento significativo no DIVED entre d15 e d180 foi evidenciado também no grupo I\_S\_Fc ( $2,50 \pm 0,71$  e  $3,33 \pm 0,58$ , respectivamente,  $p = 0,019$ ).

## 7. PCR quantitativa

### 7.1 Curva padrão para determinação da carga parasitária

Para a quantificação absoluta do número de parasitos nas amostras de sangue, coração, intestino e baço foi realizada a qPCR com iniciadores específicos do nDNA do *T. cruzi*. Para isso, foi feita uma curva padrão com diluições seriadas de concentrações conhecidas do parasito ( $10^2$  a  $10^{-3}$  parasitos) com eficiência de 97,7%,  $R^2$  igual a 0,995 e inclinação de -3,37 (Figura 13). Desta forma, consideramos que o limite de detecção do nosso ensaio é de 0,001 parasito, ou seja, amostras com quantidade inferior foram consideradas negativas.

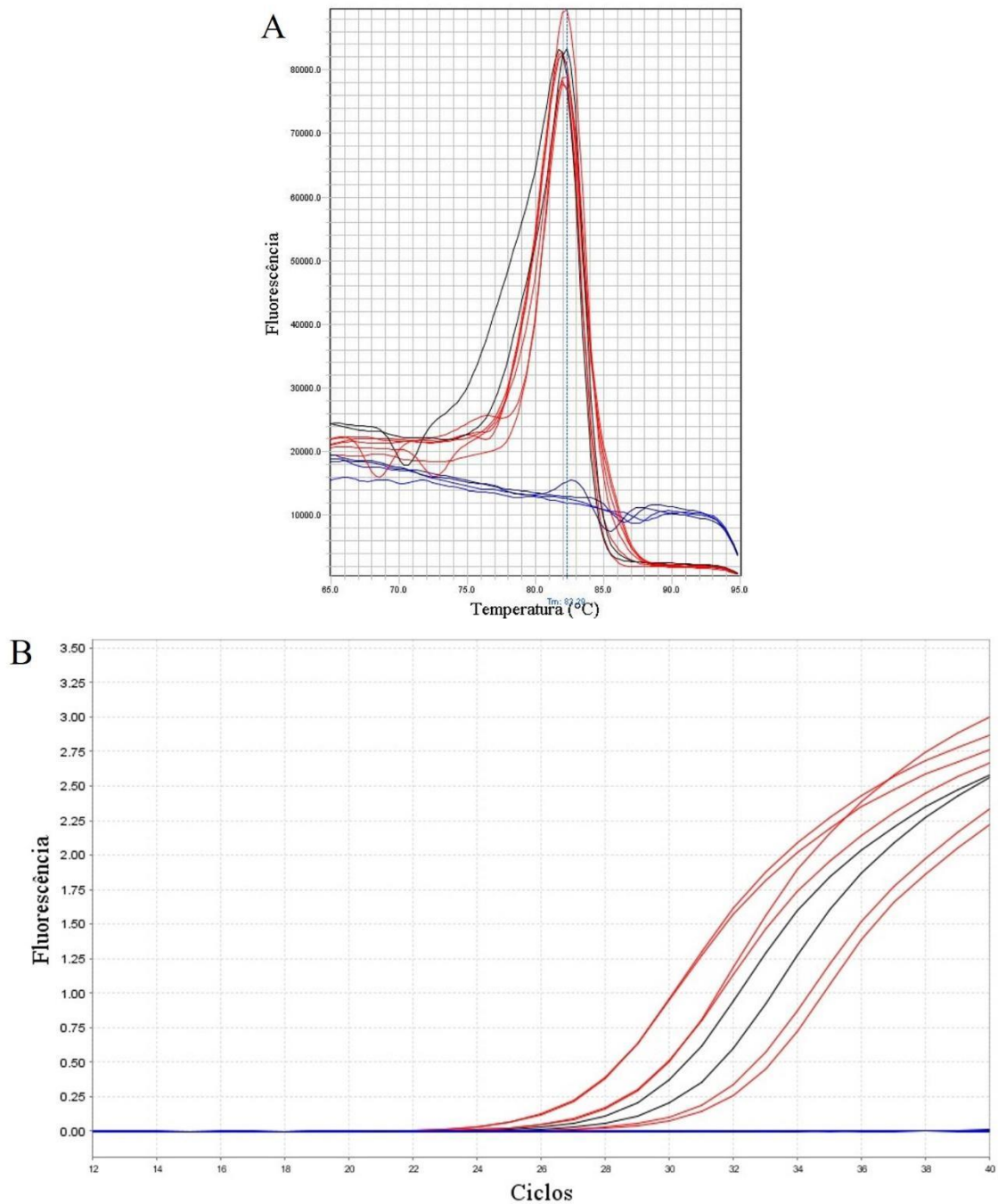




**Figura 13. Curva padrão a partir da amplificação de amostras de *Trypanosoma cruzi* com concentrações variadas.** Na parte superior à direita está a equação da reta e o coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ). Os círculos pretos com bordas azuis indicam cada uma das amostras de *T. cruzi* com concentrações de  $10^2$  a  $10^{-3}$  parasitos/mL. Cq: ciclo de quantificação.

## 7.2 Quantificação de DNA do *Trypanosoma cruzi*

A qPCR tendo como alvo nDNA do *T. cruzi* foi realizada nas amostras de sangue, coração, baço e intestino grosso em todos os grupos experimentais. A Figura 14 ilustra a curva de dissociação derivada e a curva de amplificação linear de amostras de sangue de camundongos do estudo, assim como os controles negativos (branco e amostras de camundongo não infectado pelo *T. cruzi*) e controle positivo (amostras de *T. cruzi*). O padrão visto na figura foi semelhante para todos os tecidos.



**Figura 14. Padrão das curvas de dissociação e amplificação das amostras.** A: Curva de dissociação derivada. B: Curva de amplificação linear. Em azul escuro: branco e controle negativo. Em vermelho: amostras de sangue de camundongos pertencentes ao estudo. Em preto: amostras de *T. cruzi*.

A qPCR permitiu a detecção do parasito em todas as amostras de tecidos infectados, com exceção de uma amostra do baço de camundongo do grupo I\_EpoFa. A

carga parasitária variou bastante entre os diferentes tecidos (Tabela 6). O número de parasitos foi particularmente baixo no baço. Como esperado, a Epo não apresentou efeito tripanocida. Entretanto, no coração a quantidade de DNA do *T. cruzi* foi menor no grupo I\_EpoFc ( $p < 0,0001$ ), enquanto no baço ela foi maior neste mesmo grupo ( $p < 0,0001$ ) quando comparado aos outros grupos experimentais.

**Tabela 6.** Análise da carga parasitária nos grupos experimentais e nos diferentes tecidos (sangue, coração, baço e intestino).

Grupos Experimentais	Sangue	Coração	Intestino	Baço
NI_SFa	0.000 ±0a	0.000 ±0a	0.001±0.001a	0.000 ±0a
I_SFa	0.297 ±0.196b	0.328 ±0.272b	0.123 ±0.140b	0.003 ±0.001b
NI_EpoFa	0.000 ±0.001a	0.001 ±0.001a	0.000 ±0a	0.000 ±0a
I_EpoFa	1.623 ±1.290c	0.487 ±0.369b	0.023 ±0.011b	0.003 ±0.003b
NI_SFc	0.000 ±0a	0.000 ±0a	0.000 ±0a	0.000 ±0a
I_SFc	1.586 ±0.825c	0.708 ±0.401b	0.117 ±0.109b	0.002 ±0.001b
NI_EpoFc	0.000 ±0a	0.001 ±0.001a	0.000 ±0.000a	0.000 ±0.000a,b
I_EpoFc	2.061 ±1.750c	0.109 ±0.108c	0.078 ±0.038b	0.016 ±0.014c

Valores em média ± desvio-padrão.

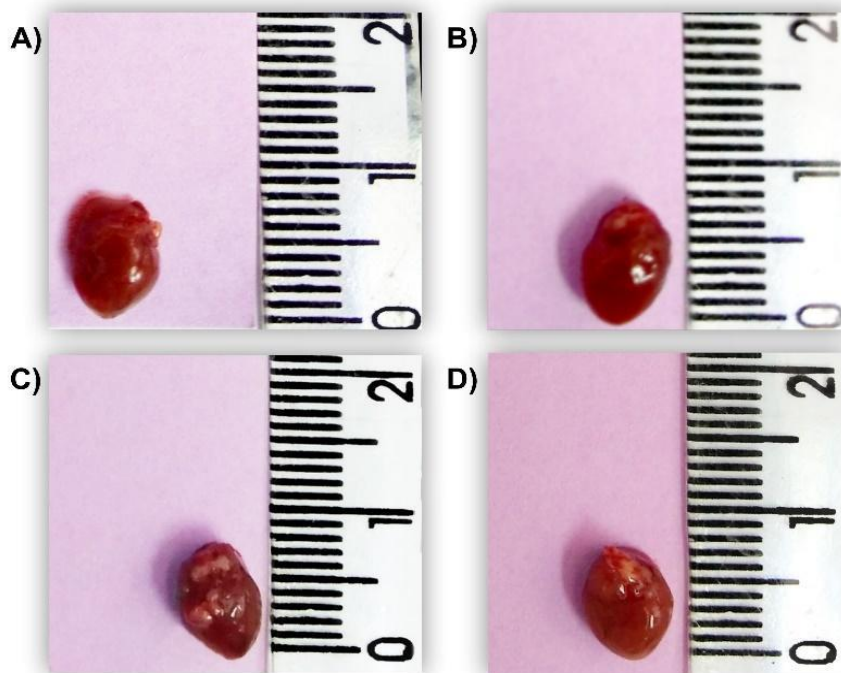
Valores na mesma coluna que não dividem a mesma letra são significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ).

NI\_SFa: grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda (d1 a d30).

NI\_EpoFa: não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa: infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa: infectado tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). NI\_SFc: não infectado com administração de salina na fase crônica (d90 a d120). NI\_EpoFc: não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc: infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc: infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120).

## 8. Avaliação Histopatológica

O coração e o baço foram analisados macroscópica e microscopicamente. Em relação a avaliação macroscópica do coração, não foi observado a olho nu diferença na morfologia e tamanho do órgão entre os camundongos dos diferentes grupos experimentais. A Figura 15 ilustra este achado apresentando um painel de imagens dos corações de camundongos I e NI tratados ou não com Epo. Quando os corações foram pesados após eutanásia, o peso absoluto do órgão e o peso relativo (razão peso corporal final/peso do coração) foram bastante semelhantes entre os diferentes grupos, sem efeito da Epo.

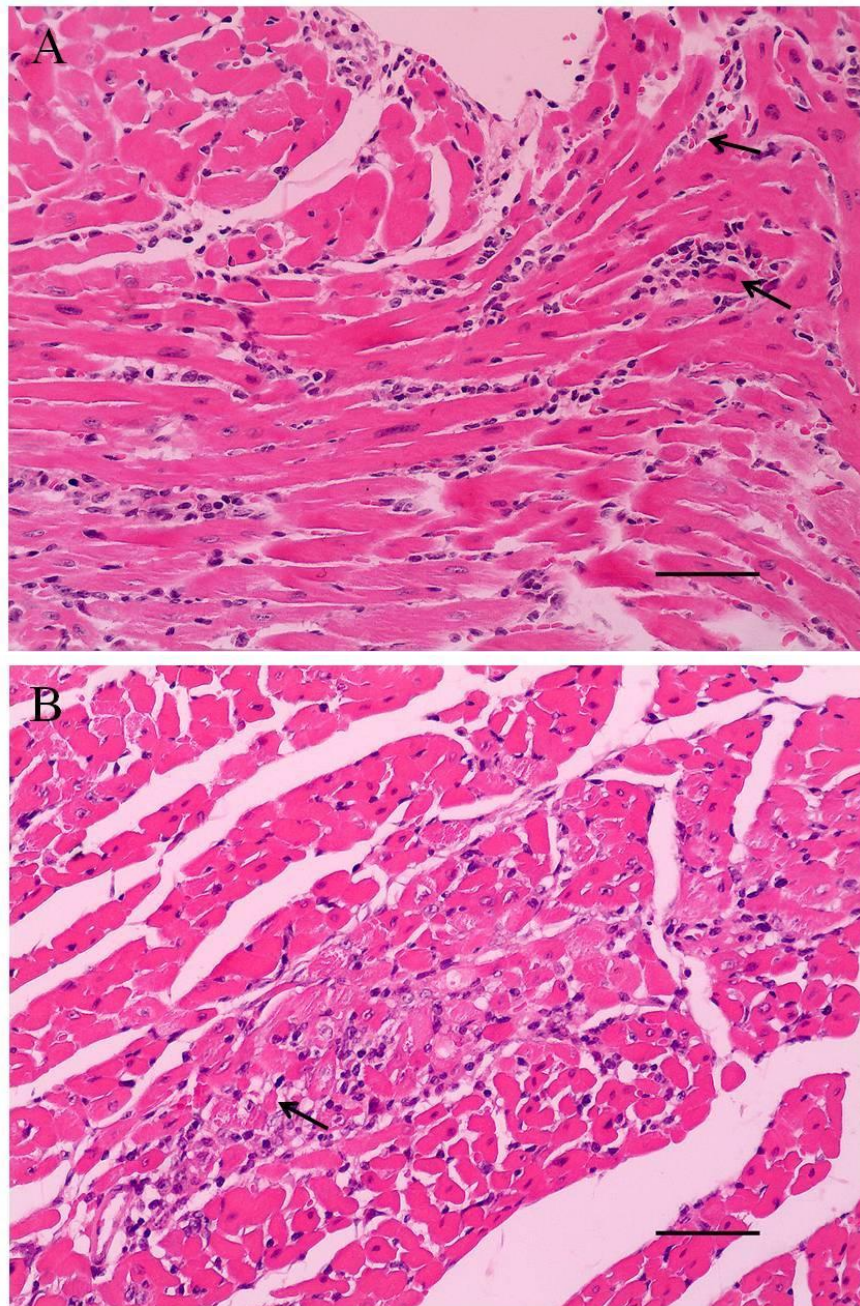


**Figura 15. Fotos do coração coletado após eutanásia ilustrando a semelhança de morfologia e tamanho no órgão em diferentes grupos experimentais. 10A:** Coração de camundongo não infectado que recebeu solução salina de d90 a d120 (animal do grupo NI\_SFc). **10B:** Coração de camundongo não infectado tratado com Epo de d90 a d120 (NI\_EFc). **10C:** Coração de camundongo infectado pelo *T. cruzi* que recebeu solução salina de d90 a d120 (I\_SFc). **10D:** Coração de camundongo infectado pelo *T. cruzi* e tratado com eritropoietina na fase crônica (I\_EpoFc).

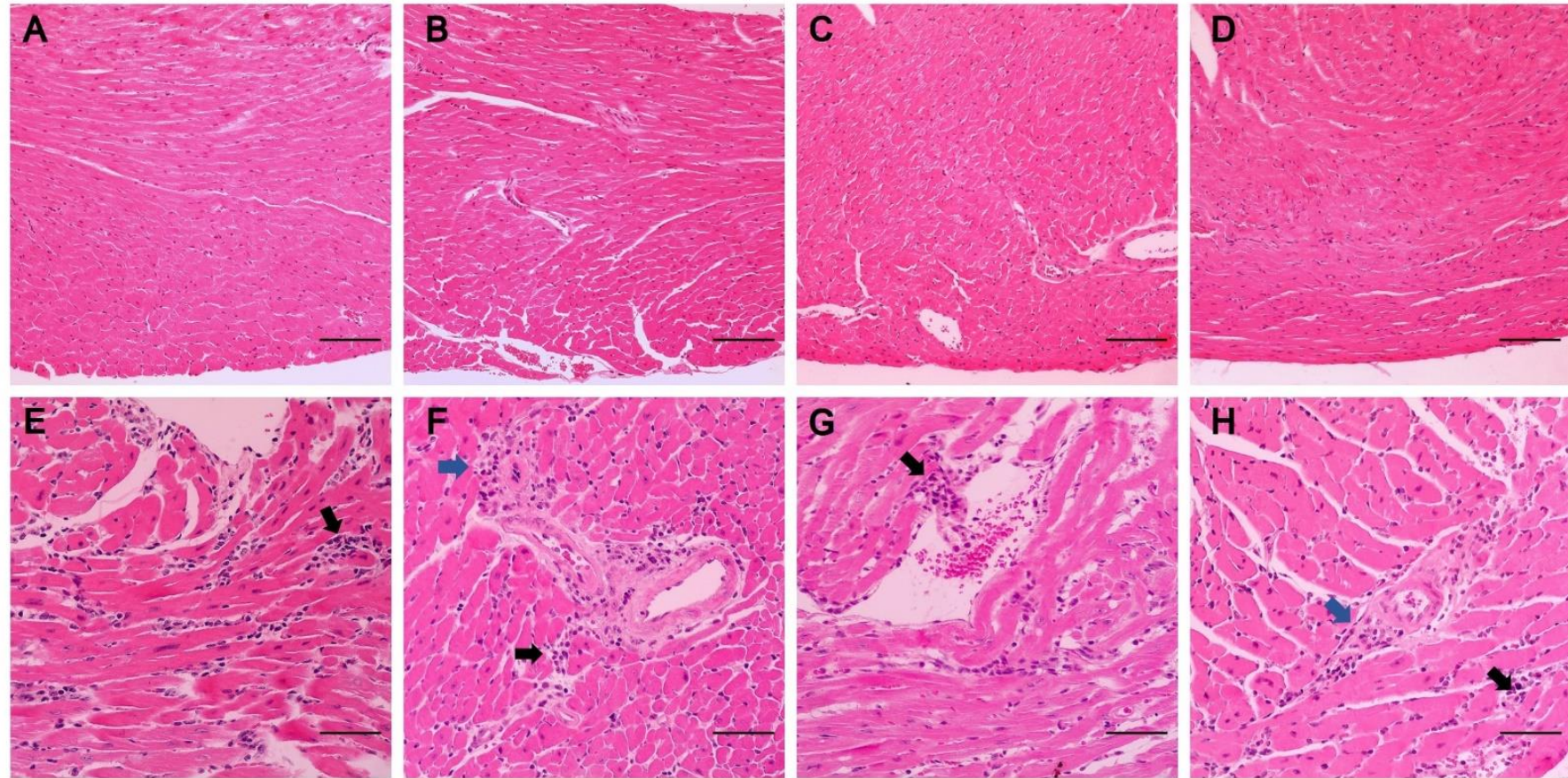
A avaliação da resposta tecidual foi realizada através de análise microscópica dos tecidos infectados e não infectados pelo *T. cruzi*, tratados ou não com Epo, para a detecção de possíveis alterações. No tecido cardíaco foram avaliados necrose de cardiomiócitos, infiltrado mononuclear perivascular multifocal, infiltrado mononuclear intersticial multifocal e fibrose. Já no tecido esplênico e intestino grosso foram analisados hiperplasia dos folículos esplênicos e infiltrado inflamatório mononuclear multifocal, respectivamente.

Foram observadas necrose de cardiomiócitos e fibrose cardíaca apenas nos grupos I\_SFa e I\_EpoFa (Figura 16), enquanto os infiltrados inflamatórios multifocais nas regiões perivascular e intersticial do coração estavam presentes em todos os grupos

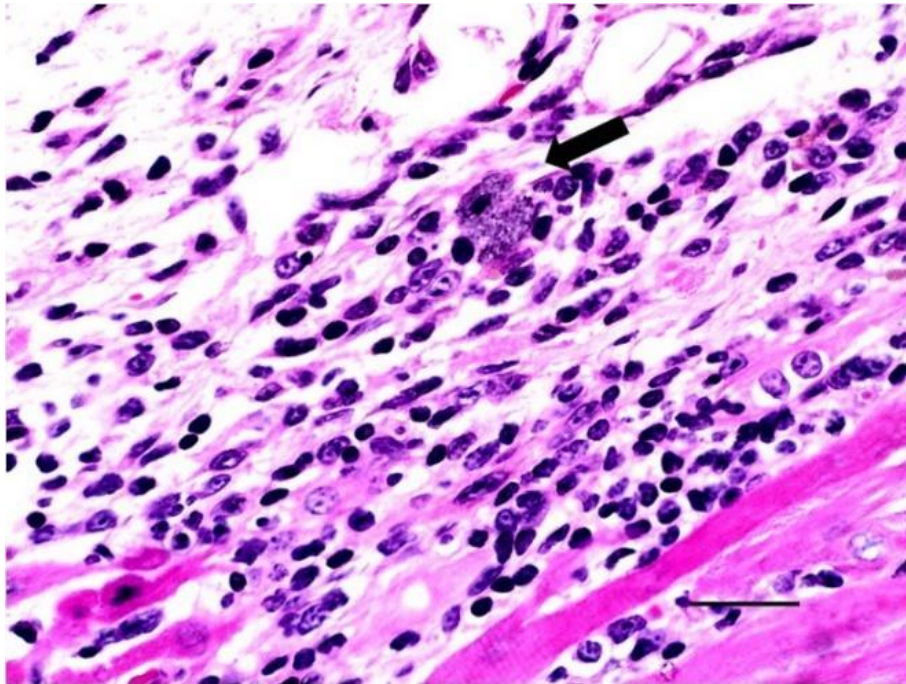
infectados sem efeito da Epo (Figura 17) (Tabela 7). Ninhos de amastigotas foram encontrados no coração apenas em um camundongo do grupo I\_Sfa (Figura 18).



**Figura 16. Cortes histológicos do tecido cardíaco de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, tratados ou não com eritropoietina. 17A: Coração de camundongo infectado pelo *T. cruzi* que recebeu solução salina de d1 a d30 (I\_SFa) mostrando tecido com infiltrado inflamatório, fibrose e necrose (esta última, indicada pela seta preta). 17B: Coração de camundongo infectado tratado com eritropoietina (Epo) de d1 a d30 (I\_EpoFa) mostrando tecido com infiltrado inflamatório, fibrose e necrose (esta última, indicada pela seta preta). HE. Barra: 100  $\mu$ m.**

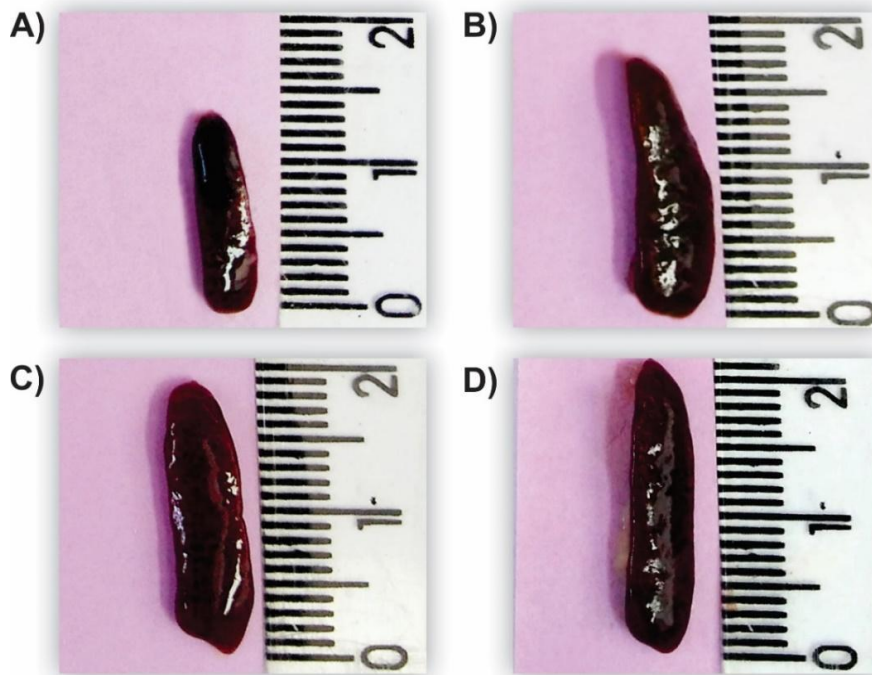


**Figura 17. Cortes histológicos do tecido cardíaco de camundongos não infectados e infectados pelo *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com eritropoietina.** No painel superior observam-se imagens do tecido cardíaco sem alteração: 17A: Camundongo do grupo NI\_SFa; 17B: Camundongo do grupo NI\_SFc; 17C: Camundongo do grupo NI\_EpoFa e 17D: Camundongo do grupo NI\_EpoFc. No painel inferior, são observadas alterações no tecido cardíaco: 17E: Camundongo do grupo I\_SFa mostrando infiltrado inflamatório multifocal na região intersticial; 17F: Camundongo do grupo I\_SFc mostrando infiltrados inflamatórios multifocais nas regiões perivascular e intersticial; 17G: Camundongo do grupo I\_EpoFa mostrando infiltrado inflamatório multifocal na região intersticial e 17H: Camundongo do grupo I\_EpoFc mostrando infiltrado inflamatórios multifocais nas regiões perivascular e intersticial. HE. Barra: 100 µm.



**Figura 18. Ninho de amastigotas no tecido cardíaco de camundongos infectado pelo *T. cruzi*.** Camundongos infectado que recebeu solução salina na fase aguda da doença de Chagas. Além dos ninhos de amastigota, é possível observar intenso infiltrado inflamatório. A seta preta indica região com cardiomiócitos. Barra: 100  $\mu$ m.

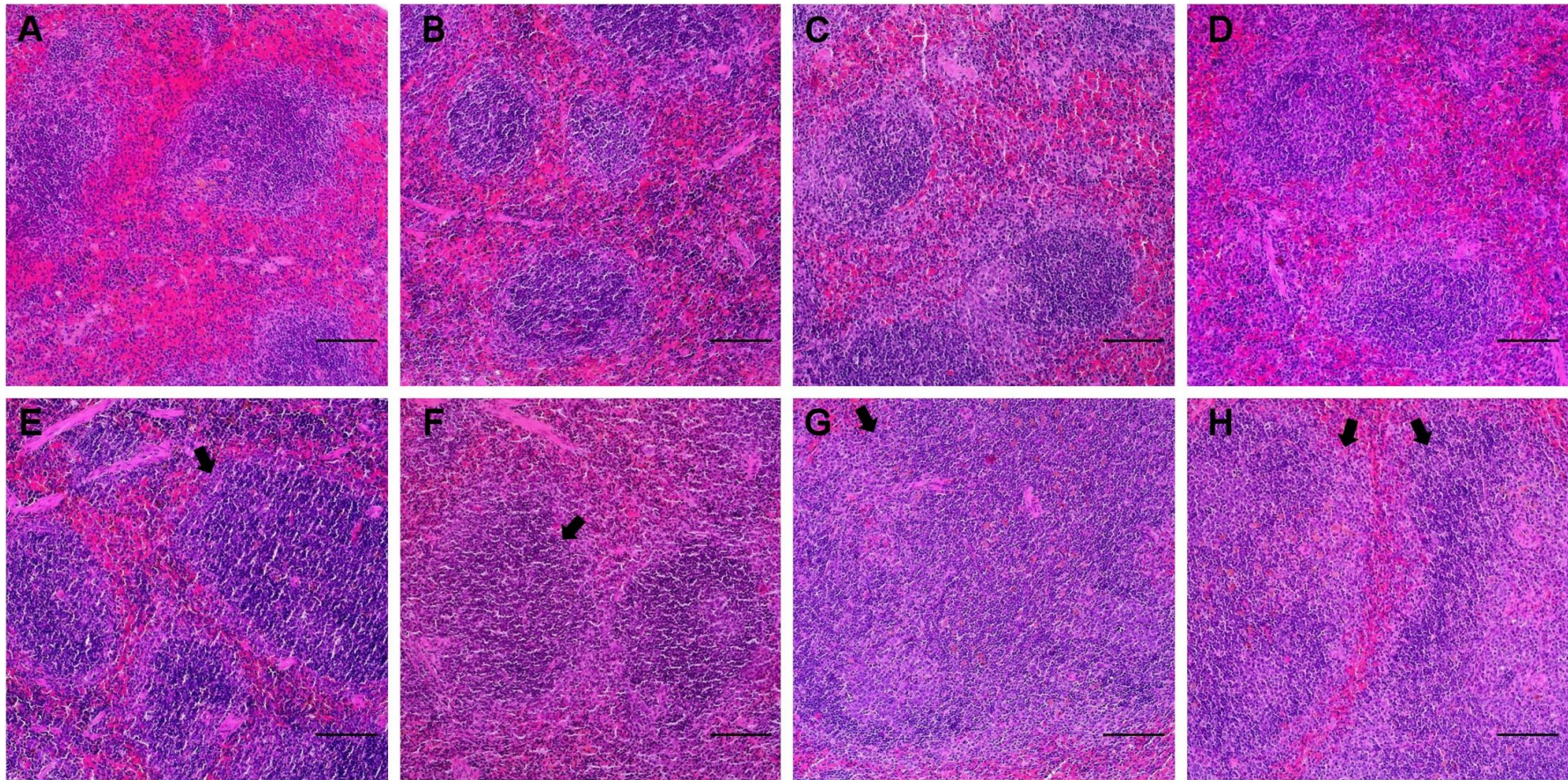
Na avaliação macroscópica do baço foi observado esplenomegalia em todos os camundongos infectados pelo *T. cruzi* sem efeito da Epo. Diferença significativa no peso do baço dos animais I em relação aos NI ( $p = 0,0197$ ) foi observado. A Figura 19 ilustra a esplenomegalia em animais infectados tratados ou não com Epo.



**Figura 19. Fotos do baço coletado após eutanásia mostrando esplenomegalia nos grupos infectados pelo *T. cruzi*, sem efeito da eritropoietina.** 19A: Baço de camundongo não infectado que recebeu solução salina de d90 a d120. 19B: Baço de camundongo não infectado pelo *T. cruzi* tratado com Epo de d90 a d120, em que é possível observar a esplenomegalia. 19C: Baço de camundongo infectado pelo *T. cruzi* que recebeu solução salina na fase crônica, em que é possível observar a esplenomegalia. 19D: Baço de camundongo infectado pelo *T. cruzi* e tratado com eritropoietina na fase crônica, em que é possível observar a esplenomegalia.

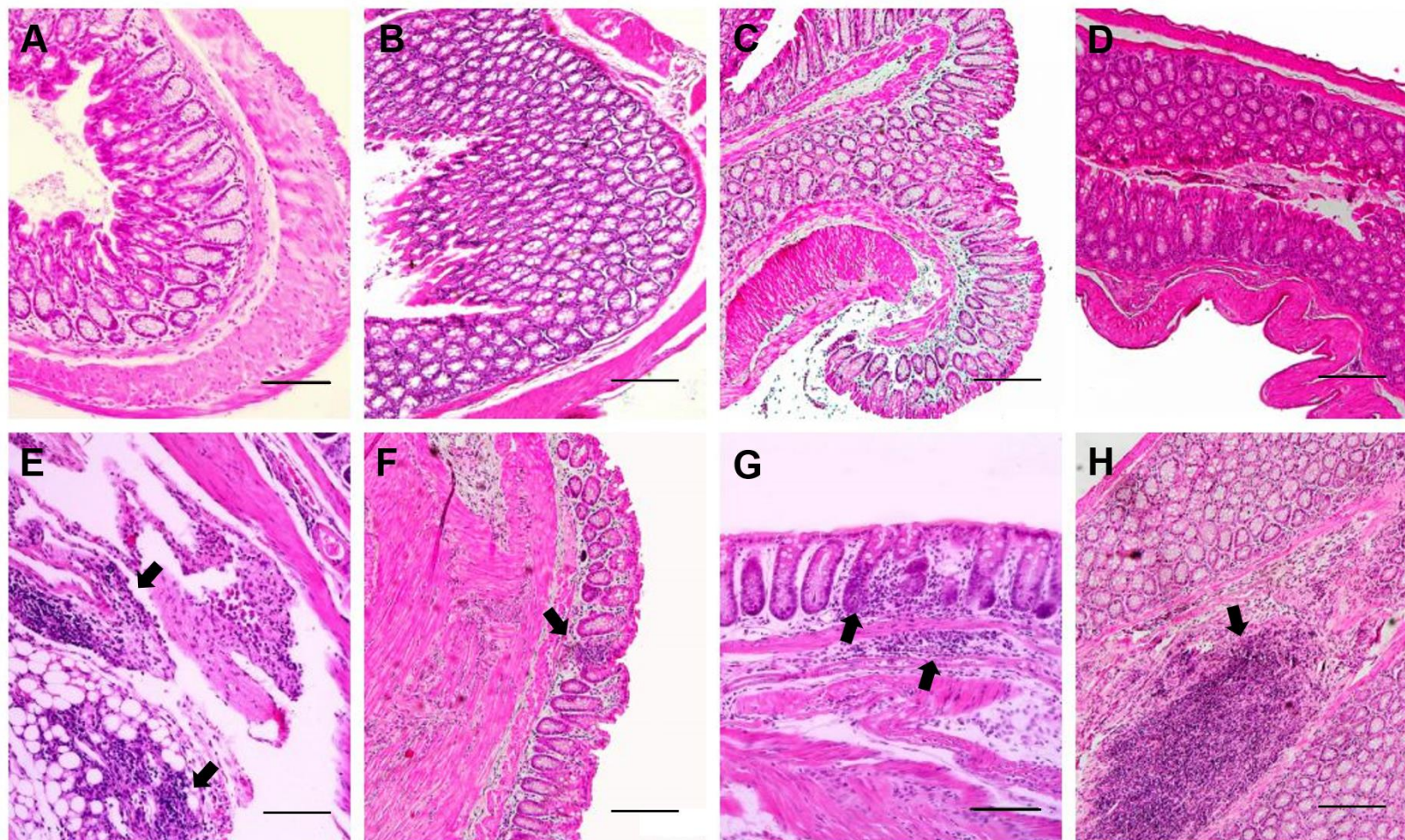
Alterações microscópicas no tecido esplênico foram observadas em todos os grupos, mesmo que fossem mínimas (Tabela 7). A análise estatística mostrou um efeito significativo da infecção ( $p < 0,0272$ ) com animais infectados mostrando grandes alterações e um efeito significativo da substância ( $p < 0,0011$ ) em que os camundongos tratados com Epo apresentaram mais hiperplasia folicular do baço (Figura 20).





**Figura 20. Cortes histológicos do tecido esplênico de camundongos não infectados e infectados pelo *Trypanosoma cruzi* tratados ou não com eritropoietina.** No painel superior observam-se imagens do baço sem alteração: 20A: Camundongo do grupo NI\_SFa; 20B: Camundongo do grupo NI\_SFc; 20C: Camundongo do grupo NI\_EpoFa; 20D: Camundongo do grupo NI\_EpoFc. No painel inferior observam-se baços com diferentes graus de alteração tecidual: 20E: Camundongo do grupo I\_SFa mostrando hiperplasia dos folículos linfóides; 20F: Camundongo do grupo I\_SFc mostrando hiperplasia dos folículos linfóides; 20G: Camundongo do grupo I\_EpoFa mostrando hiperplasia acentuada dos folículos linfóides; 20H: Camundongo do grupo I\_EpoFc hiperplasia acentuada dos folículos linfóides. HE. Barra: 100 µm.

O intestino grosso de todos os grupos de camundongos não infectados apresentou aparência morfológica normal. A infecção pelo *T. cruzi* teve um efeito significativo neste tecido ( $p < 0,0001$ ), causando infiltrado inflamatório mononuclear multifocal (Figura 21). Os grupos tratados com Epo apresentaram tendência a menor quantidade de células infiltradas (Tabela 7).



**Figura 21. Cortes histológicos do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.** No painel superior observam-se imagens do intestino grosso sem alteração: 21A: Camundongo do grupo NI\_SFa; 21B: Camundongo do grupo NI\_SFc; 21C: Camundongo do grupo NI\_EpoFa; 21D: Camundongo do grupo NI\_EpoFc. No painel inferior, são observadas alterações no intestino grosso: 21E: Camundongo do grupo I\_SFa mostrando infiltrado inflamatório mononuclear multifocal; 21F: Camundongo do grupo I\_SFc mostrando infiltrado inflamatório mononuclear multifocal; 21G: Camundongo do grupo I\_EpoFa mostrando infiltrado inflamatório mononuclear multifocal; 21H: Camundongo do grupo I\_EpoFc infiltrado inflamatório mononuclear multifocal. HE. Barra: 100  $\mu$ m.

**Tabela 7.** Análise histopatológica para a detecção de alterações existentes nos diversos tecidos (coração, baço e intestino grosso).

Grupos Experimentais		Coração			Baço	Intestino Grosso	
		Necrose	Fibrose	Infiltrado inflamatório (região perivascular)	Infiltrado inflamatório (região intersticial)	Hiperplasia dos folículos	Infiltrado inflamatório
NI_SFa	Presença#	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	2/7 (28.6%)	0/7 (0%)
	Quantificação*	0	0	0	0	0.286	0
NI_EpoFa	Presença#	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)
	Quantificação*	0	0	0	0	1.200	0
I_SFa	Presença#	5/7 (71.4%)	2/7 (28.6%)	6/7 (85.7%)	5/7 (71.4%)	3/7 (42.9%)	3/7 (42.9%)
	Quantificação*	0.714	0.286	0.857	1.429	0.429	0.857
I_EpoFa	Presença#	2/7 (28.6%)	1/7 (14.3%)	5/7 (71.4%)	6/7 (85.7%)	4/7 (57.1%)	3/7 (42.8%)
	Quantificação*	0.286	0.143	0.714	1.143	0.571	0.429
NI_SFc	Presença#	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	4/7 (57.1%)	0/7 (0%)
	Quantificação*	0	0	0	0	0.63	0
NI_EpoFc	Presença#	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	5/5 (100%)	0/5 (0%)
	Quantificação*	0	0	0	0	1.200	0
I_SFc	Presença#	0/3 (0%)	0/3 (0%)	2/3 (66.7%)	3/3 (100%)	1/3 (33.3%)	3/3 (100%)
	Quantificação*	0	0	0.667	1.000	0.333	1.000
I_EpoFc	Presença#	0/8 (0%)	0/8 (0%)	3/8 (37.5%)	7/8 (87.5%)	6/8 (75%)	5/8 (62.5%)
	Quantificação*	0	0	0.375	1.000	0.750	0.625

#Presença: indicada em n amostral apresentando a alteração/n total e em porcentagem.

\*Quantificação: Total de alterações quantificadas/n

Valores na mesma coluna que não dividem a mesma letra são significativamente diferentes ( $p < 0,0001$ ).

NI\_SFa: grupo não infectado pelo *T. cruzi* com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). NI\_EpoFa: não infectado e tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). I\_SFa: infectado com administração de salina na fase aguda (d1 a d30). I\_EpoFa: infectado tratado com Epo na fase aguda (d1 a d30). NI\_SFc: não infectado com administração de salina na fase crônica (d90 a d120). NI\_EpoFc: não infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120). I\_SFc: infectado com administração de salina da fase crônica (d90 a d120). I\_EpoFc: infectado tratado com Epo na fase crônica (d90 a d120).

## VI. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, novos compostos e esquemas terapêuticos têm sido testados para combater a infecção pelo *T. cruzi*, alguns deles com resultados promissores (Silva *et al.*, 2008; Buckner *et al.*, 2012; Maximiano *et al.*, 2010; Soeiro *et al.*, 2013). Entretanto, apesar dos avanços, ainda não foram encontrados tratamentos realmente eficazes, particularmente para a fase crônica da doença. A necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas mais eficientes, seguras e acessíveis permanecem (Urbina *et al.*, 2009).

A eritropoietina (Epo) tem sido usada na medicina cardiovascular há anos (van der Meer *et al.*, 2004) devido às suas propriedades na redução de processos apoptóticos, inflamatórios e isquêmicos (Ricksen *et al.*, 2008; Buemi *et al.*, 2002) e ao seu potencial em reverter a remodelagem ventricular, melhorando, assim, a função miocárdica (Calvillo *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2009). Entretanto, não é conhecida a ação da Epo no curso da DC. Em nossas buscas não encontramos trabalhos publicados com avaliação dos efeitos desta molécula no coração do paciente infectado pelo *T. cruzi*. Desta forma, este trabalho teve como objetivo averiguar os possíveis efeitos cardioprotetores da Epo em animais experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*. Assim, foi realizado o tratamento com Epo na fase aguda, pois os acontecimentos no início da infecção definem o curso da doença (Dutra; Gollob, 2008) e também na fase crônica.

Em estudos com animais, a dose de Epo utilizada é mais elevada que a administrada em humanos. Em roedores é comum a utilização de 5000 UI/kg (Jerndal *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2014). Contudo, nos estudos com altas doses o tratamento é de curta duração e na ausência da infecção pelo *T. cruzi*. Em nosso trabalho não foi realizado estudo de dose-resposta. Fez-se a opção pelo uso de 2000 UI/kg (como em Andrade *et al.*, 2018) uma vez que o tratamento seria realizado durante um mês. Altas doses de Epo podem provocar um aumento rápido e elevado no hematócrito aumentando a viscosidade sanguínea o que resulta em sobrecarga cardíaca com possíveis complicações como hipertensão, trombose e acidente vascular encefálico (Cernaro *et al.*, 2014).

Por ser considerado um bom modelo experimental para estudos sobre a DC (Gonçalves *et al.*, 1998), o trabalho foi realizado em camundongos (*Mus musculus*). A linhagem escolhida foi C57BL/6, pois são mais resistentes à infecção (Gonçalves-da-Costa *et al.*, 2002) minimizando a possibilidade de morte durante o período experimental e reduzindo o número de animais necessários. Em relação ao sexo, o trabalho foi feito com

fêmeas, pois segundo Trischmann e Bloom (1982) estas são mais resistentes ao *T. cruzi*, aumentando a taxa de sobrevivência. Como o grau de resistência varia com a cepa do parasito (Andrade *et al.*, 1985), a utilizada para inoculação dos animais foi a Colombiana (classificada como TcI), pois esta apresenta alta infectividade (Zingales *et al.*, 2009). Desta forma, consideramos uma boa escolha a junção de linhagem de camundongos resistente à infecção pelo *T. cruzi* com cepa patogênica.

O aumento do tamanho do baço é visto em inúmeras condições patológicas e geralmente é causado por doenças que acometem outros órgãos. As doenças infecciosas podem ser responsáveis por até 36% dos casos (para revisão, Rotbain *et al.*, 2017). Esse aumento decorre do fato do baço, órgão do sistema imune, estar envolvido nas infecções do organismo (Pereira *et al.*, 1999). No presente estudo foi possível observar a olho nu o aumento no volume do baço em todos os animais infectados, como também nos tratados com Epo, infectados ou não. A análise histopatológica confirmou esses achados. A esplenomegalia observada nos casos de infecção pelo *T. cruzi* pode ser resultado do processo infeccioso, mas também consequência de alterações hemodinâmicas devido a alterações cardíacas (Pereira *et al.*, 1999). De maneira surpreendente, a hiperplasia dos folículos esplênicos foi mais frequente nos camundongos NI tratados com Epo (80% dos animais) em comparação aos I tratados com Epo (67%). A esplenomegalia já foi descrita como um efeito adverso da Epo (Sato *et al.*, 1992). Já foi mostrado, por exemplo, que durante períodos de estresse eritropoiético o baço pode ter seu tamanho aumentado em até 10 vezes (Richmond *et al.*, 2005). Carneskog *et al.* (1999) mostraram que diferentes tipos de policitemia provocam um aumento no volume do baço.

Na fase aguda da DC, principalmente quando a transmissão acontece por via oral, a esplenomegalia pode ser observada (Pinto *et al.*, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2009). Nesta fase, o aumento no volume do baço é facilmente explicado pela reação imunológica sistêmica. De acordo com Simões *et al.* (2018), somado a isso, a esplenomegalia está correlacionada a elevada parasitemia. Contudo, em estudo com cachorros na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, Vieira *et al.* (2009) não detectou, por imuno-histoquímica, parasitos no baço. No presente trabalho, o parasitismo não foi avaliado na fase aguda. Na fase crônica, a carga parasitária determinada por qPCR foi extremamente baixa no baço, não sendo visto, inclusive, parasitos em uma das amostras previamente infectada pelo *T. cruzi*.

Em relação ao coração, não foi observada diferença na morfologia e tamanho do órgão entre os camundongos dos diferentes grupos experimentais ao final do experimento.

Isso difere dos resultados obtidos em humanos, onde é observado cardiomegalia em cerca de 30% dos pacientes na fase crônica sintomática (Urbina, 2010; Marin-Neto *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2010).

Em todos os animais infectados foi possível detectar o parasito no coração por qPCR. A carga parasitária foi semelhante entre os grupos infectados, com exceção do I\_EpoFc que apresentou número significativamente menor de parasitos neste tecido. Neste mesmo grupo, um menor número de animais apresentou infiltrado inflamatório na região perivascular (38%) em comparação aos outros grupos com camundongos infectados (88% nos I\_SFa, 71% nos I\_EpoFa e 67% nos I\_SFc). Sabe-se que a Epo diminui os processos inflamatórios no coração. Esta glicoproteína tem atividade antagônica às citocinas pró-inflamatórias, além de promover a cicatrização após lesão (para revisão, Nekoui; Blaise, 2017). Desta forma, esperávamos uma diferença mais marcante nos grupos tratados com Epo, com menor presença de infiltrado inflamatório, mas não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

Por outro lado, a incidência de infiltrado inflamatório na região intersticial foi semelhante entre os grupos infectados, com 100% dos animais do grupo I\_SFc apresentando essa característica. A esse respeito, a presença de infiltrado inflamatório acompanhado de alteração na função dos cardiomiócitos em camundongos infectados com a cepa Colombiana tem sido relatada na literatura (Andrade, 1990; Cruz *et al.*, 2016).

A presença de ninhos de amastigotas foi vista somente em uma amostra de tecido cardíaco do grupo I\_SFa. Na fase crônica não foram observados ninhos de parasitos no coração ou intestino. É sabido que o parasitismo tecidual crônico é menor que na fase aguda, desta forma, a utilização de técnicas de imuno-histoquímica talvez permitisse a visualização de ninhos de amastigotas no miocárdio, intestino grosso e talvez no baço.

Usando técnicas como a qPCR e sistemas de imagem de bioluminescência que são bastante sensíveis permitindo a detecção do *T. cruzi* em diferentes tecidos, mesmo em baixas quantidades (Cummings *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2014; Silberstein *et al.*, 2018), o intestino passou a ser considerado como um dos reservatórios do parasito na fase crônica da DC (Lewis *et al.*, 2014). Em nosso estudo, foi possível detectar o DNA do *T. cruzi* em todas as amostras de intestino grosso dos animais infectados. Entretanto, a carga parasitária foi mais baixa que no sangue e no coração. Além disso, a carga parasitária nos animais I tratados com Epo apresentou uma tendência à diminuição em relação aos I não tratados. A presença de infiltrado inflamatório foi vista em todos os animais infectados. Os camundongos I que receberam salina ou Epo na fase aguda tiveram o mesmo número de

animais apresentando infiltrado inflamatório (42% em cada um dos grupos). Quando as soluções foram administradas na fase crônica da doença, 100% dos camundongos não tratados com Epo apresentaram infiltrado inflamatório, enquanto a taxa caiu para 63% nos tratados. Assim como no coração, os resultados do intestino sugerem um pequeno efeito positivo da Epo na DC murina quando o tratamento é realizado na fase crônica da infecção.

O sangue é o tecido mais utilizado para detecção do *T. cruzi* por qPCR. Na fase aguda isso acontece pela alta parasitemia no sangue periférico. As outras razões são a coleta simples e a possibilidade de obtenção de grandes volumes (Hagström *et al.*, 2019). Em nosso estudo, o sangue foi o tecido que apresentou maior carga parasitária, com o grupo I\_EpoFc apresentando quantidade significativamente maior de *T. cruzi* em relação aos grupos. Como esperado, a Epo não apresentou efeito tripanocida, mas pode ter permitido um maior número de parasitas na circulação sanguínea. Isso talvez pudesse ser explicado por uma diminuição da resposta inflamatória ocasionada pela Epo, o que poderia facilitar a sobrevivência dos parasitos na circulação dos animais tratados. Embora estudos mostrem a ação anti-inflamatória da Epo em alguns tecidos, os resultados histológicos do presente estudo não apontaram isso de maneira significativa.

Em relação às amostras de sangue, elas são utilizadas em muitos contextos experimentais, pois permitem a dosagem de um grande número de fatores, como proteínas, enzimas e hormônios. Desta forma, biomarcadores obtidos a partir do sangue são úteis no diagnóstico e prognóstico de muitas situações clínicas (Lee; Goosens, 2015). O hemograma completo permite a avaliação da composição sanguínea, que é dinamicamente regulada e, ao mesmo tempo, facilmente alterada. É um exame diagnóstico geralmente limitado, entretanto, fornece informações sobre o estado clínico geral e processos infecciosos bacterianos, virais ou parasitológicos (González; Silva, 2006). Neste sentido, os linfócitos tem papel fundamental na resposta imune do organismo. Geralmente grande quantidade é formada e liberada na circulação quando agentes estrangeiros penetram no organismo (Nikolich-Zugich *et al.*, 2004). No curso da infecção pelo *T. cruzi*, os linfócitos sofrem apoptose promovendo, entre outras coisas, liberação dos parasitos pelos macrófagos (Cabral-Piccin *et al.*, 2016). Em nosso trabalho não observamos alteração no número de linfócitos após 180 dias de infecção. Na realidade, a contagem sanguínea das subpopulações de WBC não variou entre os diferentes grupos experimentais.

Os linfócitos compreendem 70 a 80% do total WBC em camundongos (Weiss; Wardrop, 2010). Em nosso estudo identificamos valores inferiores (entre 58 a 69%) em alguns grupos experimentais. Vale ressaltar que o número de WBC varia, entre outros, com



os procedimentos realizados durante a coleta (anestesia, horário da coleta, via de coleta, ...). Desta forma, é fundamental manter controladas as variáveis durante a coleta de sangue para minimizar divergência nos resultados (Weiss; Wardrop, 2010). Entretanto, o procedimento de coleta foi padronizado (plexo orbital sob anestesia). Apenas o horário de coleta pode ter sido variável, pois ela se iniciava às 9h da manhã, mas em função do número de animais experimentais, finalizava ao meio dia.

Em relação ao número de WBC totais, este estava aumentado nos grupos NI\_SF<sub>a</sub> e I\_SF<sub>a</sub> no início do período experimental (d0). Isso pode significar que neste momento o organismo desses animais estava submetido a algum estresse fisiológico que foi corrigido ao final do experimento (d180) quando houve um decréscimo significativo, sendo este mais importante no grupo NI\_SF<sub>a</sub>. Alterações hormonais ocorrem em situações de estresse e isto modifica a concentração das células sanguíneas (Engler *et al.*, 2004). Apesar da observação de infiltrado inflamatório no coração e intestino dos animais infectados com presença importante de linfócitos, evidenciado pelos estudos histopatológicos, a modificação na série branca circulante no sangue não foi evidenciada.

Pelo pequeno tamanho corporal, nos camundongos, a contagem de RBC é mais elevada que em outras espécies, variando entre 7 a 11 x10<sup>6</sup> mm<sup>3</sup> (Weiss; Wardrop, 2010). Os valores encontrados nos diferentes grupos experimentais permaneceram próximos a esta faixa (média geral = 8,04 x10<sup>6</sup> mm<sup>3</sup>). Em camundongos pode-se considerar como valor de referência 10 a 17 g/dL a concentração de HGB (Weiss; Wardrop, 2010). Os grupos NI\_EpoF<sub>a</sub>, NI\_EpoF<sub>c</sub> e I\_SF<sub>c</sub> tiveram valores levemente abaixo no d0 (9,04 a 9,73 g/dL). Em relação ao Ht, em camundongos ele é considerado normal estando entre 35 e 52% (Weiss; Wardrop, 2010). Todos os grupos experimentais tiveram o hematócrito dentro desta faixa. O animais NI\_SF<sub>a</sub> apresentaram valores baixos de Ht no d0 (35,50% ±4,50). Estes foram significativamente inferiores aos outros grupos experimentais. González & Scheffer (2003) afirmam que variações no hemograma podem ocorrer em função da idade, alimentação, manejo, alojamento e, é claro, do estado de saúde. Contudo, como todos os animais foram mantidos no mesmo rack ventilado e sob as mesmas condições de umidade, temperatura e alimentação, nós não conseguimos explicar essa diminuição no Ht no grupo NI\_SF<sub>a</sub>.

Como mencionado anteriormente, informações a respeito do estado clínico podem ser obtidos através da determinação dos parâmetros bioquímicos (González *et al.*, 2001). No presente estudo foi avaliado as atividades séricas de CK total, CK-MB e AST em diferentes períodos experimentais A enzima AST é classicamente utilizada para avaliação

hepática, pois é encontrada em altas quantidades no fígado. Contudo, também está presente no músculo esquelético e no coração em menores quantidades, sendo útil para identificação de alterações cardíacas. Em caso de lesão nestes tecidos as enzimas saíam da célula e serão mensuradas em maior quantidade no soro/plasma sanguíneo (Stockham, 1995). Tem sido sugerido a utilização da relação CK/AST no diagnóstico de doenças cardíacas, em particular no infarto do miocárdio (Dufour, 1988). Calculamos a razão CK/AST dos diferentes grupos em d0, d15, d90 e d180 (dados não mostrados). Entretanto, como as dosagens de AST, mas principalmente de CK, apresentaram enorme variabilidade intra-grupo, isso se traduziu na razão CK/AST, não sendo percebido um padrão ou tendência, dificultando a interpretação dos resultados. Nossos dados não concordaram com a observação de Dufour (1988) que afirma que a relação CK/AST muda pouco com o tempo. Esse autor sugere que uma única medida poderia bastar para avaliar indivíduos com CK aumentada. De qualquer maneira, a interpretação da relação CK/AST deve ser feita com muita cautela, pois valores séricos aumentados para AST juntamente com valores normais de CK sugerem dano hepático e não muscular.

Stockham (1995) afirma que injeções intramusculares podem permitir a saída da AST (assim como da CK e CK-MB) das fibras musculares aumentando os valores séricos. Porém, em nossos animais as soluções administradas (salina ou Epo) e a anestesia (no momento da colheita sanguínea) foram realizadas por via intraperitoneal. Por outro lado, algumas amostras estavam hemolisadas no momento da avaliação bioquímica. Isso pode justificar valores de AST (ou CK e CK-MB) mais elevados, pois as hemácias contêm essa(s) enzima(s). Logo, em caso de lise a AST será liberada no soro. Como a colheita sanguínea em camundongos não permite a obtenção de grandes volumes, ao mesmo tempo em que não é possível fazer coletas muito frequentes de maneira a não colocar em risco o bem-estar dos animais (Hoff, 2000), todas as amostras coletadas possibilitando a realização do hemograma e da avaliação dos parâmetros bioquímicos foram utilizadas. Apenas foram eliminadas amostras sanguíneas que de fato impossibilitaram a realização dos exames. Ou seja, a utilização de amostras não adequadas para a realização do hemograma e da avaliação bioquímica pode ter trazido um viés em nossos resultados, que devem ser vistos, então, com precaução.

A CK é um bom marcador de dano muscular. Ela está presente em altas quantidades nos músculos estriados (esquelético e cardíaco) e lisos. A estrutura molecular grande da CK e de sua subunidade fração miocárdica (CK-MB) impede que elas sejam liberadas do tecido para a corrente sanguínea, exceto em casos de lesão da membrana muscular (Schneider *et*

*al.*, 1995). Da mesma forma que a AST, amostras hemolisadas ou aquelas em que a recuperação do soro a partir de amostra com coágulo foi demorada podem produzir um aumento nos valores de CK, pois as hemácias possuem substâncias que interferem na dosagem desta enzima (Stockham, 1995). Caso isso aconteça, a elevação encontrada representa um resultado errôneo devido a falha metodológica.

Os valores de CK variaram bastante intra e extra grupos. Em todos os grupos experimentais maiores quantidades de CK foram dosadas em d90 comparado ao d15, exceto no I\_EpoFa. Neste grupo a atividade sérica da CK em d15 foi significativamente mais elevada que nos outros períodos. Como esses animais foram tratados na fase aguda, talvez a Epo tenha assegurado uma proteção nas células do miocárdio, permitindo a diminuição de danos no tecido cardíaco. Entretanto, se essa ação protetora de fato aconteceu, ela não impediu que com 180 dias de infecção os animais apresentassem valores de CK superiores aos mensurados em d0.

Assim como a dosagem da CK sérica, a CK-MB é bastante usada como marcador de lesão ou doença nos músculos esqueléticos e cardíaco (Schneider *et al.*, 1995). A administração de Epo fez com que os níveis de CK-MB séricos fossem significativamente menores em comparação aos que receberam salina. Isso indica um efeito protetor da Epo no miocárdio.

A função cardíaca dos animais foi avaliada através de ecografia transtorácica (ETT). Com o uso da ETT em modo M, é possível visualizar anormalidade anatômica e fisiológica do coração de forma não invasiva. (Bestetti *et al.*, 2016). A ETT é um método útil no diagnóstico de disfunção ventricular, sendo de importância na cardiomiopatia crônica da doença de Chagas (Simões *et al.*, 2018; Nunes; Rocha, 2009), embora seu interesse no prognóstico da DC ainda não esteja bem estabelecido (Viotti *et al.*, 2004). Entretanto, o uso desta técnica em nosso estudo apresentou algumas limitações. O aparelho usado nos exames é de uso veterinário, porém não específico para utilização em animal de pequeno porte como camundongos. Desta forma, não foi possível coletar dados de todos os parâmetros usualmente avaliados na ETT.

Idealmente, a ETT deveria ser realizada sem anestesia para evitar seus efeitos negativos no controle autonômico do coração, na contratilidade do miocárdio e na frequência cardíaca (FC) (Pachon *et al.*, 2015). Entretanto, em nosso estudo os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de ketamina e xilazina e embora a dose tenha sido padrão, a resposta dos animais pode variar. Além disso, o tempo entre a

anestesia e a realização da ETT deve ser o mesmo para todos os animais para evitar diferentes graus de recuperação da anestesia. Assim, a escolha do anestésico apropriado, a dose a ser usada e o conhecimento de possíveis alterações no sistema cardiovascular devem ser levados em consideração para a acurácia dos resultados (Baudouy *et al.*, 2017). Embora a mistura de ketamina e xilazina seja usada, Pachon *et al.* (2015) mostraram que a ketamina sozinha é uma melhor opção. Diante do exposto, embora a FC tenha sido aferida durante a ETT ela foi desconsiderada para evitar viés nos resultados. Em consequência, os valores de débito cardíaco (Qc) também não foram levados em conta.

De maneira geral não foram encontradas muitas diferenças nos parâmetros ecocardiográficos avaliados. A utilização de equipamento específico para uso laboratorial em pequenos roedores permite precisão nas medidas avaliadas e a detecção precoce de alterações cardíacas (Esporcatte *et al.*, 2010). Apesar disso, ecocardiogramas para uso animais e até mesmo para uso humano têm sido adaptados para avaliação da função cardíaca em camundongos (Baudouy *et al.*, 2017). Para a obtenção de imagens satisfatórias em pequenos roedores é necessário utilizar transdutores com frequências entre 10 a 15 MHz (para revisão, Abduch *et al.*, 2013). Nós utilizamos 11 MHz.

No presente trabalho, nem a infecção pelo *T. cruzi* e nem o tratamento com a Epo alterou de maneira significativa a função cardíaca. Talvez isso tenha acontecido, pois a linhagem de camundongos utilizada neste estudo é resistente às infecções pelo *T. cruzi*. Além disso, embora camundongos sejam muito utilizados como modelo da DC, ao considerar a disfunção ventricular esquerda, eles parecem não reproduzir a doença humana e isso é uma limitação para todos os estudos que tentam avaliar terapias para cardiomiopatia chagásica (Mello *et al.*, 2015).

Em relação ao diâmetro diastólico do VE (DIVED), que fornece uma ideia global da função ventricular, no d90 o grupo I\_EpoFc apresentou aumento em comparação ao NI\_EpoFc. Isso evidencia um papel negativo da infecção nesta variável, sem efeito da Epo, pois o tratamento nestes grupos começou após a realização do exame.

Geralmente, os parâmetros mais usados para avaliar quantitativamente a função do sistólica do VE é a FE e a FEt (Ortiz *et al.*, 1986). Apesar de não haver diferença estatística na FE ao longo do período experimental em cada um dos grupos, exceto para o I\_EpoFa, existe uma tendência a sua manutenção nos camundongos infectados e tratados com Epo na fase crônica. A observação da Tabela 5 permite verificar que a FE foi acima de 55%,

indicando ausência de comprometimento cardíaco, em todos os animais dos grupos NI\_EpoFa e I\_EpoFc. Por outro lado, comprometimento cardíaco grave foi visto em um animal do grupo NI\_SFa, um do I\_SFa e em dois I\_EpoFa.

A FEt foi menor nos animais infectados tratados com Epo em relação aos infectados que receberam salina, sugerindo que a Epo não melhora este parâmetro. No grupo I\_EpoFa foi observado a deterioração da capacidade sistólica do VE (indicada pelo FE e FEt) com a cronificação da infecção e isso após 30 dias de tratamento com Epo na fase aguda. Esse resultado foi confirmado pelos estudos histopatológicos, pois este grupo apresentou necrose de cardiomiócitos, fibrose no tecido cardíaco (achados presentes somente neste grupo e no I\_SFa), além de intenso infiltrado inflamatório no miocárdio.

## VII. CONCLUSÃO

Retomando os objetivos específicos, podemos fazer as seguintes conclusões:

- Estudo do perfil hematológico: De maneira geral, os valores encontrados estavam dentro dos valores de referência para camundongos C57BL/6 saudáveis. A realização do exame após infecção de longo prazo (180 dias) resultou em poucas modificações nos parâmetros hematológicos. A realização do hemograma em outros momentos durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* poderia trazer informações mais valiosas.
- Verificação de alteração em parâmetros bioquímicos indicadores de lesões cardíacas: Não há valores de referência validados e aceitos para camundongos, embora uma série de estudos tenham sido feitos na tentativa de estabelecer o perfil bioquímico nesses animais. No presente estudo foi percebido uma grande variabilidade intra e inter-grupos na atividade sérica das enzimas AST, CK e CK-MB. Vale ressaltar que a administração de Epo fez com que os níveis de CK-MB séricos fossem significativamente menores em comparação aos animais que receberam salina. Isso sugere um efeito protetor da Epo no miocárdio.
- Avaliação do funcionamento cardíaco através de ecocardiograma: Apesar de não haver modificações significativas importantes na FE, foi possível notar que 100% dos animais infectados tratados com Epo na fase crônica (I\_EpoFc) tiveram FE normal. O mesmo só aconteceu no grupo NI\_EpoFa. Isso sugere um efeito positivo da Epo na função cardíaca.
- Avaliação da influência do tratamento com Epo na carga parasitária em camundongos infectados pelo *T. cruzi*: A qPCR se mostrou um bom método para quantificação da carga parasitária em diferentes tecidos. Maior número de parasitos foi observado no sangue, em relação aos outros tecidos avaliados. A carga parasitária no sangue tendeu a ser maior nos grupos tratados com Epo.
- Análise dos efeitos do tratamento com Epo no coração, baço e intestino grosso de camundongos infectados pelo *T. cruzi* mediante análise histopatológica:
  - Hiperplasia dos folículos esplênicos foi observada em todos os grupos, mas ela foi mínima nos animais não infectados. Os camundongos tratados com Epo apresentaram hiperplasia folicular mais intensa. Talvez o estresse hematopoiético

causado pelo tratamento com Epo tenha provocado essa alteração de maneira duradoura.

- No intestino de todos os camundongos não infectados apresentou aparência morfológica normal, enquanto os infectados apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear multifocal. Os grupos tratados com Epo apresentaram tendência a menor quantidade de infiltrado inflamatório.

- De maneira geral os resultados histopatológicos do tecido cardíaco confirmaram os achados ecográficos e de atividade da CK-MB. Enquanto no grupo I\_EpoFa necrose e fibrose foram observados, além de infiltrado inflamatório, as imagens do grupo I\_EpoFc sugerem um possível efeito positivo da Epo.

Diante do exposto, podemos concluir que a Epo parece não ter efeitos significativos quando administrada isoladamente na DC murina, já que apenas alguns dos parâmetros avaliados sugeriram um efeito cardioprotetor. Desta forma, mais estudos são necessários para comprovar seu real interesse nas infecções pelo *T. cruzi*.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUCH MCD., *et al.* **A Ecocardiografia no Laboratório Cardiovascular: Um Guia para a Pesquisa com Animais.** Arq Bras Cardiol. v.102, n.1, 2013. doi: 10.5935/abc.20130239

ADAMSON JW. **Regulation of red blood cell production.** Am J Med, v.101, p.S4-6, 1996. doi: 10.1016/s0002-9343(96)00160-x

AGUILERA E., *et al.* **Polypharmacology in the treatment of Chagas disease.** Curr Med Chem. v.26, n.23, p.4476-4489, 2019. doi: 10.2174/0929867325666180410101728.

ALBERCA LN., *et al.* **Discovery of novel polyamine analogs with anti-protozoal activity by computer guided drug repositioning.** Journal of computer-aided molecular design, v. 30, n. 4, p. 305-321, 2016. doi: 10.1007/s10822-016-9903-6

ALBERTS B., *et al.* **Molecular biology of the cell.** Garland Publishing. v.3, p.1361, 1994.

ANDRADE DC., *et al.* **Efeitos agudos das injeções sistêmicas de eritropoietina na atividade quimiosensorial do corpo carotídeo após estimulação hipóxica e hipercapnica.** 2018. In: GAUDA E., *et al* Quimreceptores Arteriais. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 1071. Springer, Cham. 2018.

ANDRADE V., *et al.* **Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v.18, n.3, p.143-154, 1985. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821985000300004>

ANDRADE JP., *et al.* **Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy.** Arq Bras Cardiol, v. 96, p. 434-442, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0066782X2011000600002>

ANDRADE SG. **Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardial pathology in mice.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 85, n. 1, p. 17–27, 1990. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761990000100003>



ANDREWS KT; FISHER G; SKINNER-ADAMS T.S. **Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases.** International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v.4, n.2, p.95–111, 2014. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.02.002

ANTINORI S; GALIMBERTI L; BIANCO R., *et al.* **Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world.** European Journal of Internal Medicine. v. 43, p. 6–15, 2017. doi: 10.1016/j.ejim.2017.05.001.

BAUDOY D., *et al.* **Echocardiographic and Histological Examination of Cardiac Morphology in the Mouse.** J. Vis. Exp. v.128, p.e55843, 2017. doi:10.3791/55843

BENNETT WM. **Side effects of erythropoietin therapy.** Am J Kidney Dis. v.4, n.1, p. 84-6, 1991. PMID: 1928085

BERN C. **Chagas' Disease.** N Engl J Med. v. 30, n. 5, p. 456-66, 2015. doi: 10.1056/NEJMra1410150.

BERN C; MONTGOMERY SP. **An estimate of the burden of Chagas disease in the United States.** Clin Infect Dis. v. 49, p. e52-e54, 2009. doi: 10.1086/605091

BESTETTI RB; RESTINI CBA; COUTO LB. **Descobertas de Carlos Chagas como Pano de Fundo para a Construção Científica da Cardiopatia Chagásica Crônica.** Arq Bras Cardiol. v.107, n.1, p.63-70, 2016.

BISIO M. *et al.* **Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: Prospective polymerase chain reaction study in pregnancy.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 105, n. 10, p. 543–549, 2011. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.07.003.

BOTELHO S; MARTINS M; REIS A. **Análise de medicamentos novos registrados no Brasil na perspectiva do Sistema Único de Saúde e da carga de doença.** Ciênc. saúde coletiva. v. 23, n. 1. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232018231.21672015>

BRASIL PEAA., *et al.* **ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis.** BMC Infect. Diseases., v.10, p.337, 2010. doi: 10.1186/1471-2334-10-337

BRENER Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. 1997. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/nf9bn/pdf/dias9788575412435-03.pdf>

BUCKENER AF; URBINA JA. **Desenvolvimentos recentes em inibidores do estero14-desmetilase para a doença de Chagas**. Revista Internacional de Parasitologia: Drogas e resistência às drogas. v.2, p.236-242, 2012.

CABRAL-PICCIN., *et al.* **Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection**. Cell Death and Disease v.7, p. e2232, 2016.

CALVILLO L., *et al.* **Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling**. Proc. Natl. Acad. Sci. v. 100, p. 4802–4806, 2003.

CARNESKOG J., *et al.* **The red cell mass, plasma erythropoietin and spleen size in apparent polycythaemia**. Eur J Haematol. v.62, p. 43-48, 1999.

CAVALCANTI LPG., *et al.* **Microepidemics of acute Chagas' disease by oral transmission in Ceara**. Cad Sau de Colet; v.17, p.911–21, 2009.

CERNARO V., *et al.* **Does erythropoietin always win?** Curr Med Chem. v.21, n.7, p.849-54, 2014.

CHAGAS C. **New human trypanosomiasis. Morphology and life cycle of *Schizotrypanum cruzi*, the cause of a new human disease**. Mem Inst Oswaldo Cruz. p. 159–218. 1909. Disponível em:[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000280&pid=S0074-0276200600050000100042&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000280&pid=S0074-0276200600050000100042&lng=pt)

CHAGAS C. **Processos patojenicos da tripanozomiasse americana**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.8, n.2, p.5-35. 1916b

CHATEAUVIEUX S., *et al.* **Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway**. Biochemical Pharmacology, v.81, n.4, p.498–509., 2011. doi:10.1016/j.bcp.2010.11.011

CHOI D; KIM M; PARK J. **Erythropoietin: physico and biochemical analysis**. J Chromatogr B. v.687, p.189-99, 1996.

CONSTANTINESCU SN., *et al.* **The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction.** Elsevier Science. v. 10, n. 1, p. 18-23. 1999.

COTTART CH; NIVET-ANTOINE V; BEAUDEUX JL. **Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans.** Molecular Nutrition & Food Research, v. 58, n. 1, p. 7–21, 2014.

COURA JR. **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, 2015.

COURA JR; DE CASTRO SL. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

CRESCENTE A., *et al.* **Ocorrência de 4 casos agudos de Doença de Chagas na Vila de Icoaraci, PA.** In: Anais XXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Belém, p.29, 1992.

CRUZ JS., *et al.* **Altered cardiomyocyte function and *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, n. 5, p. 1028–1033, 2016.

CUMMINGS KL; TARLETON RL. **Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR.** Mol. Biochem. Parasitol. v.129, p. 53-59, 2003.

DA SILVA MTA., *et al.* **In vivo and in vitro auranofin activity against *Trypanosoma cruzi*: Possible new uses for an old drug.** Experimental parasitology, v. 166, p. 189-193, 2016.

DE CASTRO SL., *et al.* **The trypanocidal activity of amidine compounds does not correlate with their binding affinity to *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA.** Antimicrob Agents Chemother. v.55, p.4765–4773, 2011.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00229-11>.

DE FIGUEIREDO DL., *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.

DE PONTES VMO., *et al.* **Adverse reactions in Chagas disease patients treated with benznidazole, in the State of Ceará.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.43 n.2, 2010.

DIAS., *et al.* **Surto de doença de Chagas aguda associada à transmissão oral.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v.41, n.3, p.296-300, 2008.

DIAS JCP; COURA JR. **Epidemiologia. In: Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas.** Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral. p. 33-66, 1997.

DIAS JCP; NETO VA.; **Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 44, s. 02, p. 68-72, 2011.

DIAS JCP., *et al.* **2 nd Brazilian consensus on Chagas disease, 2015.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.49, n. 3 p.60, 2016.

DIAS LC., *et al.* **Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs.** Química Nova, p. 2444-2457, 2009.

DÍAZ ML., *et al.* **Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia.** Parasites & Vectors. v.8, p.608, 2015.

DUARTE L., *et al.* **Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease.** Colomb Med. v. 45, n.2, p. 61–6, 2014. PMID:25100890

DUFOUR DR. **Creatine kinase: aspartate aminotransferase activity ratio as an indicator of the source of an increased creatine kinase activity.** Clin Chem. v.34, p.2506–10, 1988.

DUTRA WO; GOLLOB KJ. **Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease.** Curr Opin Infect Dis. v.21, n.3, p.287-92, 2008. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f88b80.

EKBLOM BT. **Erythropoietin**. In: Performance-enhancing substances in sport and exercise. USA: Bahrke M.S., Yesalis C.E. (Human Kinetics). p.101-107, 2002.

EL HASNAOUI-SAADANI R., *et al.* **Epo deficiency alters cardiac adaptation to chronic hypoxia**. Respiratory Physiology & Neurobiology, v.186, n.2, 146–154, 2013. doi:10.1016/j.resp.2013.01.003

ENGLER H., *et al.* **Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alfa and beta-adrenergic mechanisms**. Journal of Neuroimmunology, v. 156, p. 153-162, 2004.

FAURO R., *et al.* **Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease**. Parasitology, v. 140, n.7, p. 917-927, 2013.

FERNANDES CD., *et al.* **Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up**. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.104, n.1, p. 27-32, 2009.

FERREIRA RS., *et al.* **Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and non peptidic cruza in inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents**. J Med Chem, v. 57, n. 6, p. 2380-92. 2014.

MAXIMIANO FP; COSTA GHY; SOUZA J. **Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol**. Quim. Nova, Vol. 33, No. 8, 1714-1719, 2010.

FURLANI D., *et al.* **Intracardiac erythropoietin injection reveals anti-inflammatory potential and improved cardiac functions detected by Forced Swim Test**. Transplant Proc., v.40, n.4, p. 962-966, 2008.

GHALI JK., *et al.* **Randomized double-blind trial of darbepoetin alfa in patients with symptomatic heartfailure and anemia**. Circulation. v.117, n.4, p.526–35, 2008.

GONÇALVES DA COSTA SC., *et al.* ***Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes**. Histol Histopathol. v.17, n.3, p.837-44, 2002. doi: 10.14670/HH-17.837.

GONÇALVES TCM., *et al.* **Uma investigação sobre a ecologia de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) e seu possível papel na transmissão de *Trypanosoma cruzi*, na**

**localidade de Triunfo, município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.93, p.711-7, 1998.

GONTIJO ED., *et al.* **Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas.** *Epidemiol Serv Saude.* v.18, n.3, p.243-54, 2009.

GONZÁLEZ FHD; SILVA SC. **Perfil bioquímico sanguíneo.** In: González FHD, Silva SC (eds) *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*, 2ª ed. UFRGS, Porto Alegre, p. 313–358, 2006.

GONZÁLEZ FHD., *et al.* **Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.** *Arq. Fac. Vet. UFRGS.* v.29, p.1-6, 2001.

GONZÁLEZ FHD; SCHEFFER JF. **Perfil Sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional.** In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. *Anais. Porto Alegre: UFRGS.* p. 73-89, 2003.

GUEDES PM., *et al.* **Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*.** *Rev Bras Parasitol Vet.* v.21, n.2, p.151-6, 2012.

GUIDO RVC; ANDRICOPULO AD; OLIVA G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** *Estudos avançados*, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HAGSTRÖM L; MARQUES ALP; NITZ N; HECHT MM. **The use of qPCR in human Chagas disease: a systematic review.** *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v.19, n.10, 875-894, 2019. DOI: 10.1080/14737159.2019.1659729

HAGSTRÖM L., *et al.* **Epo is relevant neither for microvascular formation nor for the new formation and maintenance of mice skeletal muscle fibres in both normoxia and hypoxia.** *J Biomed Biotechnol.* 137817, 2010.

HOFF J. **Methods of blood collection in the mouse.** *Lab Animal.* v.29, n.10, p.47-53. 2000.

HOWARD EJ; XIONG X; CARLIER Y; ESTANI SS; BUEKENS P. **Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis.** BJOG. v. 121, p. 22–33, 2014.

INSTITUTO BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. **Casos de doença de chagas têm aumento de 216% em 2016 no Acre.** Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/noticias/1282-casos-de-doenca-de-chagas-temaumento-de-216-em-2016-no-acre>>.

JELKMANN W. **Physiology and pharmacology of erythropoietin.** Transfus Med Hemother. v. 40, p. 302–9, 2013.

JERNDAL M., *et al.* **A systematic review and meta-analysis of erythropoietin in experimental stroke.** J Cereb Blood Flow Metab. v.30, n.5, p.961-8, 2010. doi: 10.1038/jcbfm.2009.267.

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. 1-23. 2010.

KEENAN M; CHAPLIN JH. **A new era for chagas disease drug discovery?** Prog Med Chem, v. 54, p. 185-230, 2015.

KERTESZ N., *et al.* **The role of erythropoietin in regulating angiogenesis.** Developmental Biology, v. 276, n. 1, p. 101–110, 2004.

KÖBERLE F. **Chagas' disease and Chagas syndromes: The pathology of American Trypanosomiasis.** Advanced Parasitology, v.6, p.63-113, 1968.

LAMAS MC., *et al.* **Development of parenteral formulations and evaluations of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole.** International Journal of Pharmaceutics, v. 307, n. 2, p. 239-243, 2006.

LATINI., *et al.* **Do non-hemopoietic effects of erythropoietin play a beneficial role in heart failure?** Heart Fail Ver. v.13, p.415–423, 2008. DOI 10.1007/s10741-008-9084-z

LAUNAY T., *et al.* **Blunting effect of hypoxia on the proliferation and differentiation of human primary and rat L6 myoblasts is not counteracted by Epo.** Cell Prolif.; v.43, p.1-8, 2010.

LAURIA-PIRES L., *et al.* **Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives.** Am J Trop Med Hyg. v.63, n.3-4, p. 111-8, 2000.

LEE G; GOOSENS KA. **Sampling Blood from the lateral tail vein of the rat.** J. Vis. v.99, p.e52766, 2015.

LEPESHEVA GI., *et al.* **Structural insights into inhibition of sterol 14alpha-demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*.** J. Biol. Chem. v.285, p.25582–25590, 2010.

LEWIS MD., *et al.* **Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection.** Cellular Microbiology, v. 16, n. 9, p. 1285–1300, 2014.

LIPSIC E., *et al.* **Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside.** J Am Coll Cardiol, v.48, p. 2161–2167, 2006.

MACHADO-DE-ASSIS GF., *et al.* **A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v.108, n.7, p.873-880, 2013.

MADY C., *et al.* **Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy.** Circulation v.90, p.3098-3102, 1994.

MAIESE K; LI F; CHONG ZZ. **New avenues of exploration for erythropoietin.** JAMA. v.293, p.90–95, 2005.

MALIK LH; SINGH GD; AMSTERDAM EA. **The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease.** Clin.Cardiol. v.38-9, p.565–569, 2015.



MARIN-NETO JA., *et al.* **Cardiac autonomic impairment and early myocardial damage involving the right ventricle are independent phenomena in Chagas' disease.** Int J Cardiol. v.65, n.3, p.261-9, 1998. PMID: 9740483.

MARIN-NETO JA., *et al.* **Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease.** Circulation, n.115, p. 1109-1123, 2007.

MARTI HH. **Erythropoietin and the hypoxic brain.** Journal of Experimental Biology, v.207, n.18, p.3233–3242, 2004. doi:10.1242/jeb.01049

MARTINS TAF., *et al.* **Benznidazole/Itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease.** PloS one, v. 10, n. 6, p. e0128707, 2015.

MARTINS-MELO FR., *et al.* **Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis.** Acta Trop. v.130, p.167–174, 2014.

MARTINS-MELO FR., *et al.* **Mortality of Chagas' disease in Brazil: spacial patterns and definition of highrisk áreas.** Trop Med Int Health. v.17, n.9, p.1066-1075, 2012.

MASTROMARINO V., *et al.* **Eritropoietina e coração: fatos e perspectivas.** Clin Sci (Lond). v.120, n.2, p.51-63, 2011. doi: <https://doi.org/10.1042/CS20100305>

MAYBAUM S., *et al.* **Assessment of myocardial recovery in a patient with acute myocarditis supported with a left ventricular assist device: a case report.** The Journal of Heart and Lung Transplantation. v. 22, n. 2, p. 202-209, 2003.

MAYTA H., *et al.* **Improved DNA extraction technique from clot for the diagnosis of Chagas disease.** PLOS Neglected Tropical Diseases. 2019. | <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007024>.

MELLO DB., *et al.* **Adipose Tissue derived Mesenchymal Stromal Cells Protect Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* from Cardiac Damage through Modulation of Anti-parasite Immunity.** PLoS Negl Trop Dis. v.9, n.8, p.e0003945, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0003945. eCollection 2015.

MENDONÇA RM., *et al.* **Doença de Chagas: serviço de referência e epidemiologia Chagas disease: a reference and epidemiology center Enfermedad de Chagas: servicio de referência y epidemiologia.** Rev Bras Promoç Saúde. v.33, p.9364, 2019.

MOLINA I., *et al.* **Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease.** N Engl J Med. v. 370, p. 1899–1908, 2014.

MOON C., *et al.* **Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats.** Proc Natl Acad Sci. v. 100, p. 11612–11617, 2003.

MORILLO CA., *et al.*, for the BENEFIT Investigators\*. **Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy.** N Engl J Med. v.373, p.1295-1306, 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1507574

MS (Ministério da Saúde). **Doenças infecciosas e parasitárias – Brasil.** Guia de bolso. Ed. 8, Brasília, 2010.

NEKOU A; BLAISE G. **Erythropoietin and Nonhematopoietic Effects.** The American Journal of the Medical Sciences, v.353, n.1, 76–81, 2017. doi:10.1016/j.amjms.2016.10.009

NIKOLICH-ŽUGICH J; SLIFKA M; MESSAOUDI I. **The many important facets of T-cell repertoire diversity.** Nat Rev Immunol. v. 4, p.123–132, 2004. doi:10.1038/nri1292

NIKOLOVA V. **Resveratrol: A Crossread of Enology and Biomedicine.** Biomedical Reviews, v. 18, n. December, p. 89–101, 2007.

NOYA BA., *et al.* **Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 110, n. 03, 2015.

NUNES MCP; ROCHA MOC. **Fatores determinantes da morbimortalidade na cardiopatia chagásica crônica.** Rev Med Minas Gerais. v.19, n.4, p. 336-342, 2009.

OLIVEIRA MAB. **Doping e coração.** Rev SOCERJ. v.13, p.53-60, 2000.

OMS. **Integrando doenças tropicais negligenciadas na saúde e desenvolvimento globais.** Quarto relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. v.1, p.267, 2017. ISBN: 978 92 4 156544 8

OMS. **Chagas disease.** 2018. Disponível em: <http://www.OMS.int/chagas/disease/en/>

OMS. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2002. Disponível em: <https://apps.OMS.int/iris/bitstream/handle/10665/42443/?sequence=1>

OMS. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2015. Disponível em: <http://www.OMS.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

OMS. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Fact sheet. n.340, 2017. Disponível em: <http://www.OMS.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

OMS. **Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006–2010**. 2013. Disponível em: [https://www.OMS.int/chagas/Global\\_distribution\\_Chagas\\_disease\\_2006\\_2010.pdf](https://www.OMS.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf)

OMS. **Weekly epidemiological record**. Technical report series. v. 90, n.6, p. 33-44, 2015.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos 2009**. 2009. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_prevencao\\_doenca\\_chagas.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_prevencao_doenca_chagas.pdf)

ORTIZ J; MATSUMOTO AY; MONACO CAF. **Echocardiography in Chagas' disease. Echocardiography**. v. 3, n.1, p.41-6, 1986.

PACHON RE., *et al.* **Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice**. Am J Physiol Heart Circ Physiol. v.308, n.12, p.H1525-1529, 2015.

PARSA CJ., *et al.* **A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart**. J Clin Invest. v.112, p. 999– 1007, 2003.

PARSA CJ., *et al.* **Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts**. J Biol Chem. v.279, p.20655– 20662, 2004.

PENG W., *et al.* **The efficacy of erythropoietin in treating experimental traumatic brain injury: a systematic review of controlled trials in animal models**. J Neurosurg. v.121, n.3, p. 653-64. 2014.

PEREIRA MC; PEREIRA ML; SOUSA JP. **Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution.** *Biomaterials.* v.20, n.22, p. 2193-2198, 1999.

PEREIRA NUNES MC., *et al.* **Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects.** *J Am Coll Cardiol,* v. 62, p. 767-776, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

PEREIRA IR., *et al.* **A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine reprograms immune response and reverses chronic cardiomyopathy.** *PLoS Pathog,* v. 11, n. 1, p. 1-26. 2015.

PINTO AYN., *et al.* **Apresentação de um caso autóctone agudo de Doença de Chagas em Cachoeira do Arari, estado do Pará.** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2, v.1, p.98, 1993.

PINTO AYN., *et al.* **Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v.34, n.5, p.413-419, 2001.

PINTO., *et al.* **Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v.41, n.6, p.602-614, 2008.

PINTO JCD. **Chagas disease and the technology problem.** *Bol Oficina Sanit Panam.* v.99, n.3, p.244-57, 1985.

PINTO JCD. **Epidemiologia in *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas.** In: BRENER Z, ANDRADE ZA, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 48-74, 2000.

PONIKOWSKI P., *et al.* **Effect of Darbepoetin Alfa on Exercise Tolerance in Anemic Patients With Symptomatic Chronic Heart Failure.** *Journal of the American College of Cardiology,* v.49, n.7, p.753–762, 2007. doi:10.1016/j.jacc.2006.11.024

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

PRUNIER F., *et al.* **Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v.292, p.H522–H529, 2007.

RASSI JRA; RASSI A; MARIN-NETO JA. **Doença de Chagas.** *Lancet*, v.375, p. 1388 – 1402, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

RASSI A JR; RASSI A; DE REZENDE JM. **American Trypanosomiasis (Chagas Disease) Infectious Disease Clinics of North America.** v.26, n. 2, p. 275-291. 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.

RASSIER DE; NATALI AJ; DE ROSE EH. **Eritrocitemia induzida e dosagem sanguínea.** *Rev Bras Med Esporte.* v.1, p.11-5, 1995.

RIBEIRO V., *et al.* **Current trends in the pharmacological management of Chagas disease.** *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* v.12, p.7-17, 2019.

RIBEIRO AL., *et al.* **Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy.** *Nat Rev Cardiol*, v.9, p. 576–589, 2012.

RIBEIRO M., *et al.* **Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model.** *Experimental Parasitology*, 162. 2016.

RICHMOND TD; CHOCHAN M; BARBER DL. **Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin.** *Trends Cell Biol* v.15, p.146–155, 2005.

RIKSEN NP; HAUSENLOY DJ.; YELLON DM. **Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection.** *Trends in Pharmacological Sciences.* v.29, n.5, p.258-267, 2008.

RIVER L; SAUGY M. **Peptides hormones abuse in sport: state of the art in the detection of growth hormone and erythropoietin.** *J Toxicol-Toxin Reviews.* In press 2003.

ROQUE ALR; JASEN AM. **Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores.** In: GALVÃO, C., org. *Vetores da doença de chagas no Brasil* [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, p. 75-87, 2014.

ROSSI MA. **The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease.** Int J Cardiol. v.30, n.3, p335-40. 1991.

ROSSI MA. **Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease.** Am Heart J, v.120, p. 233-236, 1990.

ROSSI MA; CAROBREZ SG. **Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium.** Br J Exp Pathol, v.66, n.2, p. 155-160, 1985.

ROTBAIN EC., *et al.* **Splenomegaly – Diagnostic validity, work-up, and underlying causes.** PLoS ONE. v.12, n.11, p.e0186674, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186674>

ROTTA DS; SIQUEIRA L; PEDROSO D. **Transmissão Congênita da Doença de Chagas: Uma Revisão.** Arq. Ciênc. Saúde, São Paulo, 2013.

SALES JUNIOR PA., *et al.* **Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.97, n.5, p.1289–1303, 2017.

SÁNCHEZ LV; RAMÍREZ JD. **Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects.** Parasitology. v. 140, n. 02, p. 147-159. 2013.

SANCHIS-GOMAR F; JOSE VIÑA; GIUSEPPE LIPPI. **Intermittent hypobaric hypoxia applicability in myocardial infarction prevention and recovery.** v.16, n.5, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01508.x>

SANCHIS-GOMAR F., *et al.* **Erythropoietin and Myocardial Infarction.** v.4, n.6, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00360.x>

SANTOS VRC., *et al.* **Doença de Chagas aguda no estado do Pará, região amazônica: está aumentando?** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 113, n. 5, e170298, 2018. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762018000500306&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762018000500306&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 02 jan. 2020. Epub 07 maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170298>.

SANTANA RAG., *et al.* **Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon.** *Emerg Infect Dis.* v.25, n.1, p.132-135, 2019.

SATO T., *et al.* **Rapid aggravation of splenomegaly by administration of erythropoietin in a case of myelodysplastic syndrome.** *Rinsho Ketsueki.* v.33, n.12, p.1857-62, 1992.

SBARAGLINI ML., *et al.* **Neglected Tropical Protozoan Diseases: Drug Repositioning as a Rational Option.** *Curr Top Med Chem.* v.16, n.19, p.2201-22. 2016.

SCHMUNIS GA. ***Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries.** *Transfusion* v.31, p. 547-555, 1991.

SCHNEIDER CM., *et al.* **Effects of physical activity on creatine phosphokinase and the isoenzyme creatine kinase-MB.** *Ann Ernerg Med April.* v.25, p.520-524, 1995.

SHIKANAI-YASUDA MA; CARVALHO NB. **Oral transmission of Chagas disease.** *Clin Infect Dis,* v. 54, p. 845–852, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>

SIEMANN EH; CREASY LL. **Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine.** *American Journal of Enology and Viticulture,* v. 43, n. 1, p. 49–52, 1992

SILBERSTEIN E., *et al.* **A novel nanoluciferase-based system to monitor *Trypanosoma cruzi* infection in mice by bioluminescence imaging.** *PLOS ONE.* v. 13, n. 4, p. e0195879, 2018.

SILVA NJJ., *et al.* **A complexação do fármaco benznidazol anti- *Trypanosoma cruzi* melhora a solubilidade e a eficácia.** *Med. Chem.* v.51, n.14, p.4104-4114, 2008.

SILVA AR. **Transmissão Sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus*.** p.1-94, 2013. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas, Universidade de Brasília.

SIMÕES., *et al.* **Cardiomiopatia da Doença de Chagas.** *International Journal of Cardiovascular Sciences.* v.31, n.2, p. 173-189, 2018.

SIMOES MV., *et al.* **Relation of regional sympathetic denervation and myocardial perfusion disturbance to wall motion impairment in Chagas' cardiomyopathy.** Am J Cardiol. v.86, n.9, p.975-81. 2000. PMID: 11053710.

SIMOES MV., *et al.* **Cardiomiopatia da Doença de Chagas Chagas Disease Cardiomyopathy.** International Journal of Cardiovascular Sciences. v.31, n.2, p.173-189, 2018.

SKIBELI V., *et al.* **Immuno-affinity extraction of erythropoietin from human serum by magnetic beads.** In: SCHAFFNER W, GEYER H, GOTZMANN, MARECK-ENGELKE U, eds. Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of the Manfred Donike Workshop. Vol 6. Cologne, Germany: Sport & Buch Strauß. p.313-329, 1998.

SMITH K., *et al.* **Cellular basis of uraemic cardiomyopathy: a role for erythropoietin?** Eur J Heart Fail. v.11, n.8, p.732-8, 2009. doi: 10.1093/eurjhf/hfp093.

SMITH KJ., *et al.* **The cardiovascular effects of erythropoietin.** Cardiovasc Res. v.59, p. 538-548, 2003.

SOBRINHO JLS., *et al.* **Doença de Chagas: 100 anos de descoberta.** Rev. Bras. Farm, v. 90, n. 4, p. 283-289, 2009.

SOEIRO MNC., *et al.* **Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review.** Parasitology v.140, p.929-951, 2013. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013000292>.

SOUSA JM., *et al.* **Revascularização miocárdica em pacientes com idade igual ou superior a 70 anos.** Rev Bras Cir Cardiovasc. v.5, p.141-48, 1990.

SOUZA W; CARVALHO, TMU; BARRIAS ES. **Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction.** International Journal of Cell Biology, 20. 2010. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2010/295394/>

STOCKHAM SL. **Interpretation of Equine Serum Biochemical Profile Results.** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. v. 11, n. 3, p. 391-414, 1995.

STRAUSS M., *et al.* **Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Parasitology international, v. 62, n. 3, p. 293-299, 2013.



TEIXEIRA ARL., *et al.* **Prevention and Control of Chagas Disease – An Overview.** International STD Research & Reviews. v.7, n.2, p.1-15, 2018. ISRR.42594 ISSN: 2347-5196, NLM ID: 101666147.

TEIXEIRA AR; NASCIMENTO RJ; STURM NR. **Evolution and pathology in Chagas disease – a review.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 101, n. 05, p. 463-491, 2006.

TEIXEIRA DE., *et al.* **Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v.6, n.8, 2012. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>

TEIXEIRA TL., *et al.* ***Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy.** Sci Rep, v. 5, p. 1-10, 2015.

TRAMONTANO AF., *et al.* **Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway.** Biochem Biophys Res Commun v.308, p.990–994, 2003.

TRISCHMANN TM; BLOOM BR. **Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*.** Infect Immun. v.35, n.2, p.546-51, 1982.

URBINA JA. **Quimioterapia específica da doença de Chagas: relevância, limitações atuais e novas abordagens.** Acta Trop. v.115, p. 55 – 68, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.023>

URBINA JA. **Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives.** Journal Of Eukaryotic Microbiology. v. 62, n. 1, p.149-156, 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jeu.12184>.

URBINA JA. **Chemotherapy of Chagas disease.** Curr. Pharm. v.8; p.287-295, 2009.

VAN DER MEER P., *et al.* **Erythropoietin in cardiovascular diseases.** Eur Heart J. v.25, n.4, p.285-91. Review. 2004

VAN DER MEER P., *et al.* **Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction.** J Am Coll Cardiol v.46, p.125–133, 2005.

VARGAS A., *et al.* **Investigation of an outbreak of acute Chagas disease outside the Amazon Region, in Rio Grande do Norte State, Brazil, 2016.** *Cad Saude Publica.* v.34, n.1, p.5, 2018.

VARGAS-PARADA L. **Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA.** *Nature Education.* v.3, p. 63, 2010. Disponível em: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/kinetoplastids-and-theirnetworks-of-interlocked-dna-14368046>

VIANA S., *et al.* **Doença de Chagas no estado do Acre, registro de 3 casos de Miocardiopatia Chagásica Aguda autóctone no Município de Rio Branco, 1993.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27, v.1, p.77, 1994.

VIANNA G. **Contribuição para o estudo de anatomia patológica de “Molestia de Carlos Chagas”.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.3, n.2, p.276-92, 1911.

VIEIRA MR., *et al.* **Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action.** *Pharmacology & Therapeutics.* v.123, n. 2, p.143-150, 2009.

VILAR-PEREIRA G., *et al.* **Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice.** *PLoS Pathog,* v. 12, n. 10, p. e1005947, 2016.

VINHAES MC., *et al.* **Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multi-criteria decision analysis.** *Acta Tropica,* v. 137, p. 105–110, 2014.

VIOTTI R., *et al.* **Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up.** *Am Heart J.* v.127, n.1, p.151-62, 1994.

VIOTTI RJ., *et al.* **Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure.** *Heart.* v.90, n.6, p.655-60, 2004. PMID: 15145872.

WALKER DM., *et al.* **Mecanismos de invasão celular por parasitas intracelulares.** *Cell Mol Life Sci.* v.71, n.7, p.1245-63, 2014. doi: 10.1007 / s00018-013-1491-1.

WEISS DJ; WARDROP KJ. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6th ed. Ames: Wiley Blackwell, 2010.

WEN JXIAQ., *et al.* **Dok-5 is involved in cardiomyocyte differentiation through PKB/FOXO3a pathway.** Journal of molecular and Cellular Cardiology. v. 47, n.6, p.761-769, 2009.

WESTENBRINK BD., *et al.* **Therapeutic Potential of Erythropoietin in Cardiovascular Disease: Erythropoiesis and Beyond.** Current Heart Failure Reports, n. 4, p. 127-133, 2007.

ZHANG Y., *et al.* **Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism.** Int J Mol Sci. v.15, n.6, p.10296-333, 2014.

ZINGALES B., *et al.* **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 7, p. 1051–4, 2009.

## IV. ANEXO

  
**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 2 de março de 2018.

**DECLARAÇÃO – PRORROGAÇÃO DE PRAZO**

Declaramos que o projeto intitulado “EFEITOS TERAPÊUTICOS E PROTETORES DA ERITROPOIETINA NA DOENÇA DE CHAGAS.”, UnBDOC n.º 150813/2014, sob responsabilidade da Professora Luciana Hagström Bex foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (60). A presente aprovação é válida pelo período de: 25/07/2016 a 25/07/2018.



  
Prof. Dr. Cássio José da Silva  
Coordenador da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.