

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SAMUEL DATUM MOSCAVITCH

**EFEITOS DA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL A ANTÍGENOS
CARDÍACOS NA PROGRESSÃO DE MODELOS AGUDO E CRÔNICO DE
CARDIOMIOPATIA COM COMPONENTE IMUNO-INFLAMATÓRIO**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Celular e
Molecular, com ênfase em imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto.

RIO DE JANEIRO

2017

Moscavitch, Samuel Datum .

EFEITOS DA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL A ANTÍGENOS CARDÍACOS NA PROGRESSÃO DE MODELOS AGUDO E CRÔNICO DE CARDIOMIOPATIA COM COMPONENTE IMUNO-INFLAMATÓRIO / Samuel Datum Moscavitch. - Rio de Janeiro, 2017.

111 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Hugo Caire de Castro Faria Neto .

Bibliografia: f. 71-100

1. miocardite. 2. tolerância oral. 3. hipertensão. 4. insuficiência cardíaca.
5. Chagas. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha esposa Paty pelo apoio incondicional e suporte por esses anos, por aguentar tantos desafios que um doutorado traz a vida de um casal, pela compreensão quanto aos horários dedicados ao laboratório, noites mal dormidas e tantos programas que deixamos de fazer juntos.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Hugo por ter acreditado na minha capacidade de realização desse projeto e por todo o suporte.

Aos meus pais, que estiveram presente o quanto possível dando suporte emocional e foram compreensivos quanto aos meus períodos de ausência.

À minha avó Sarah que tem uma presença especial na minha vida.

Aos meus irmãos que sempre me apoiaram a seguir em frente.

À profa. Elisabeth Marostica que me teve participação fundamental desde o início deste projeto, tanto no desenvolvimento desse projeto como no meu treinamento e primeiros passos em um laboratório de pesquisa básica.

À profa. Andrea Henriques Pons que acreditou no meu potencial de ampliar meu projeto, abrindo as portas do seu laboratório, contribuindo imensamente para o meu crescimento profissional, me ensinou a ser independente no laboratório e apoio ao longo desses anos.

Aos meus amigos do LITEB, Cynthia, Dani, Nathalia, Fernando, Synara, Horita, Juliana e Marcelo Meuser, pela ajuda nos experimentos e a ótima convivência durante todo esse tempo;

Aos meus amigos de Laboratório de Farmacologia Aplicada da UFF, Isabele, Tati e Rogerio, pela ajuda fundamental nos experimentos e pela parceria no laboratório durante esse tempo.

Ao Redinei, bioterista da UFF, que sempre esteve presente, ajudando a manter a enorme colônia de ratos e tendo sido parte fundamental do processo.

Ao meu amigo Archimedes, que sempre esteve disponível para debater todos os assuntos teórico-práticos sobre esse projeto e colaborou bastante no desenvolver desse projeto.

À profa. Ana Maria Caetano que me apoiou a seguir por essa linha de pesquisa, sendo um exemplo que me guiou durante essa jornada.

Aos meus amigos de Laboratório de Imunofarmacologia que sempre estiveram disponíveis para ajudar fazendo contribuições importantes para o meu crescimento profissional.

Ao pessoal do biotério da Fiocruz, Marcos Meuser, Gabriel e Andre pela ajuda nos momentos mais críticos.

Ao prof. Evandro Tinoco pela amizade e pelo apoio incondicional, me ajudando a persistir, manter o foco em pesquisa científica e a trabalhar para conseguir alcançar meus objetivos.

TESE DE DOUTORADO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL A ANTÍGENOS CARDÍACOS NA PROGRESSÃO DE MODELOS AGUDO E CRÔNICO DE CARDIOMIOPATIA COM COMPONENTE IMUNO-INFLAMATÓRIO

Autor: Samuel Datum Moscovitch

RESUMO

Introdução: A insuficiência cardíaca é considerada uma doença multifatorial complexa com alta prevalência na população. A hipertensão e a doença de chagas compartilham em seu estágio final a insuficiência cardíaca. Evidências recentes mostram a ativação crônica de mecanismos inflamatórios e do sistema imune adaptativo em seu desenvolvimento. Objetivo: Avaliar se o tratamento com antígenos totais cardíacos (tolerância oral) é capaz de influenciar a progressão da cardiomiopatia em ratos hipertensos e camundongos com miocardite chagásica. Métodos: Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos e camundongos infectados intraperitonealmente com *T. cruzi*, cepa Y. Em ambos modelos, utilizamos o protocolo para indução de tolerância oral, com 20mg de extrato de proteínas cardíacas por via oral e, em seguida, imunização ou infecção. Resultados: Em machos hipertensos tratados por via oral e intraperitoneal com extrato de proteínas cardíacas, observamos um aumento percentual significativo de linfócitos CD4+CD25+ no tecido cardíaco, comparado a machos e fêmeas hipertensos não tratados. Também observamos no coração de machos hipertensos tratados uma redução no percentual de linfócitos CD4+TCR $\gamma\delta$ e CD28+, enquanto linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD4+CD44+ se mantiveram nos mesmos níveis a de machos hipertensos não tratados. Na análise histológica do tecido cardíaco, machos hipertensos não tratados apresentaram extensos focos inflamatórios, enquanto o grupo de machos hipertensos tratados mostrou infiltrados leucocitários organizados no endomísio e perimísio. Em camundongos com miocardite chagásica aguda, observamos no grupo tratado por via oral e infectado um maior percentual de linfócitos T CD8+ no tecido cardíaco, com um perfil de células menos ativado

(CD4+CD44+), comparado ao grupo infectado não-tratado. Na avaliação histológica do tecido cardíaco, o grupo infectado tratado apresentou uma infiltração inflamatória mais difusa e com menos focos, em contraste com o grupo infectado não tratado, que mostrou uma infiltração inflamatória mais exuberante com muitos focos. Conclusão: A exposição oral a antígenos cardíacos em ambos modelos mostrou efeitos sobre o perfil de células no tecido cardíaco, sendo na miocardite chagásica aguda a indução de maior migração de células T CD8+; e, na cardiopatia hipertensiva, um aumento no percentual de células T CD4+CD25+.

Palavras chave: tolerância oral, miocardite, hipertensão, doença de Chagas, citocinas, insuficiência cardíaca, ratos, SHR

EVALUATION OF ORAL TOLERANCE TO CARDIAC ANTIGENS IN THE PROGRESSION OF ACUTE AND CHRONIC MODELS OF CARDIOMYOPATHY WITH IMMUNO-INFLAMMATORY COMPONENT.

Author: Samuel Datum Moscovitch

ABSTRACT

Background: Heart failure is considered a complex multifactorial disease with high prevalence in general population. End stage of most of cardiomyopathies, as hypertension and Chagas' disease, is heart failure. Recent evidences associates chronic activation of innate and adaptive immunity with the progression into heart failure. Aim: To investigate the effects of oral tolerance to cardiac antigens into the progression of hypertensive cardiomyopathy and Chagas' myocarditis. Methods: It was used spontaneously hypertensive rats and, for Chagas, mice infected intraperitoneally with *T. cruzi*, strain Y. Protocol of oral tolerance was done by feeding animal models with 20mg of cardiac protein extract, followed by an immunization with same protein extract or, for Chagas, by an intraperitoneal infection. Results: In hypertensive male rats treated orally and intraperitoneally with cardiac proteins, we observed a significant increase on the percentage of CD4+CD25+ lymphocytes in cardiac tissue, compared to untreated hypertensive males and females. We also observed a reduction in the percentage of CD4+TCR $\gamma\delta$ and CD28+ lymphocytes in the cardiac tissue of treated hypertensive rats, while CD3+CD4+ and CD3+CD4+CD44+ lymphocytes remained at same levels on the untreated groups. In the histology analysis of cardiac tissue, untreated hypertensive male rats presented extensive inflammatory foci, while the group of treated hypertensive rats showed leukocyte infiltrates organized in the endomysium and perimysium. In acute Chagas' myocarditis, we observed in infected mice that received oral pre-treatment a higher percentage of CD8+ T lymphocytes, with a less activated cell profile (CD4+CD44+) compared with untreated infected mice. In histology analysis, the cardiac tissue of orally treated infected mice presented a more diffuse inflammatory infiltration with

fewer foci, in contrast to untreated infected mice, which showed a more exuberant inflammatory infiltration with many foci. Conclusion: Oral exposure to cardiac antigens in both models showed effects on the lymphocytes' phenotype from cardiac tissue. These effects in acute Chagas' myocarditis model consisted in a greater migration of CD8+ T cells; and, in hypertensive cardiomyopathy model, as an increase in the percentage of CD4+CD25+ T cells.

Keywords: oral tolerance, myocarditis, hypertension, Chagas disease, cytokines, heart failure, SHR rats

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	1
1.1.1. <i>Classificações da Insuficiência Cardíaca</i>	4
1.2. CARDIOMIOPATIA HIPERTENSIVA	7
1.2.1. <i>Modelo experimental de ratos espontaneamente hipertensos</i> .	11
1.3. CARDIOMIOPATIA NA DOENÇA DE CHAGAS	12
1.4. O SISTEMA IMUNE NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA.....	17
1.5. TOLERANCIA ORAL.....	20
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1. ANIMAIS UTILIZADOS	27
3.2. PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL.....	27
3.2.1. <i>Preparo do extrato de tecido cardíaco</i>	27
3.2.2. <i>Administração oral</i>	28
3.2.3. <i>Imunização</i>	29
3.2.4. <i>Infecção com trypanosoma cruzi</i>	29
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
3.3.1. <i>Modelo experimental de miocardiopatia crônica</i>	30
3.3.2. <i>Modelo experimental de miocardite aguda</i>	31
3.4. PARÂMETROS AVALIADOS	31
3.4.1. <i>Medida da pressão arterial em ratos hipertensos por pletismografia caudal</i>	31

3.4.2.	<i>Ecocardiografia transtorácica em ratos</i>	32
3.4.3.	<i>Isolamento de células do miocárdio</i>	32
3.4.4.	<i>Citometria de células isoladas do miocárdio</i>	35
3.4.5.	<i>Análise histológica quantitativa e qualitativa</i>	37
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.	RESULTADOS	39
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CARDIOPATIA EM RATOS HIPERTENSOS.....	39
4.1.1.	<i>Avaliação ecocardiográfica</i>	39
4.1.2.	<i>– Isolamento de células por dissociação do tecido cardíaco</i> Erro! Indicador não definido.	
4.1.3.	<i>- Citometria de células isoladas do tecido cardíaco</i>	35
4.2.	EXPERIMENTOS EM CARDIOPATIA HIPERTENSIVA.....	47
4.2.1.	<i>Citometria de coração de ratos hipertensos tratados com extrato cardíaco</i> 47	
4.2.2.	<i>Análise histológica de coração de ratos hipertensos tratados com extrato cardíaco</i>	52
4.3.	EXPERIMENTOS EM MIOCARDITE CHAGÁSICA.....	55
4.3.1.	<i>Citometria de coração de camundongos C57BL/6 infectados com T.cruzi</i>	55
4.3.2.	<i>Análise histológica de coração de camundongos C57BL/6 infectados com T.cruzi</i>	59
5.	DISCUSSÃO	62
5.1.	CARDIOPATIA CRÔNICA HIPERTENSIVA.....	62
5.2.	CARDIOPATIA AGUDA CHAGÁSICA.....	68
6.	CONCLUSÕES	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	71

ÍNDICE

FIGURA 1. DIAGRAMA ILUSTRATIVO QUE MOSTRA A PROGRESSÃO DOENÇA CARDÍACA HIPERTENSIVA E SUAS COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES.	8
FIGURA 2. ILUSTRAÇÃO SOBRE A INTERAÇÃO COMPLEXA ENTRE ESTRESSE MECÂNICO (HEMODINÂMICO) E ESTRESSE NEURO-HUMORAL, E AS VIAS PRINCIPAIS PARA ESTÍMULO A EXPRESSÃO DE GENES HIPERTRÓFICOS.	11
FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO REPRESENTANDO A INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL.	23
FIGURA 4. ETAPAS DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DE LEUCÓCITOS POR DISSOCIAÇÃO DO TECIDO CARDÍACO. ESTÁGIO INICIAL (A), INTERMEDIÁRIO (B) E FINAL (C) DO PROCESSAMENTO TECIDUAL.	34
FIGURA 5. CITOMETRIA DE FLUXO INICIAL DE CÉLULAS ISOLADAS DO TECIDO CARDÍACO DE MACHOS E FÊMEAS SHR DE 18 MESES DE IDADE	37
FIGURA 6. CORTES DE CORAÇÃO CORADOS POR H&E DE MACHOS SHR (A) E FEMEAS (B).....	43-46
FIGURA 7. GRÁFICO DE FENOTIPAGEM DE CÉLULAS ISOLADAS DE POOL DE CORAÇÕES, POR CITOMETRIA, DE MACHOS SHR NÃO TRATADOS (N=3), MACHOS SHR TRATADOS COM EXTRATO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS POR VIA ORAL E INTRAPERITONEAL (N=3), E FÊMEAS SHR NÃO TRATADAS (N=3).	48
FIGURA 8. ANÁLISE FENOTÍPICA DA CITOMETRIA DE CÉLULAS ISOLADAS DE POOL DE CORAÇÕES DE MACHOS SHR NÃO TRATADOS (N=3), MACHOS SHR TRATADOS COM EXTRATO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS POR VIA ORAL E INTRAPERITONEAL (N=3), E FÊMEAS SHR NÃO TRATADAS (N=3)	49
FIGURA 9. GRÁFICO DA FENOTIPAGEM DE CÉLULAS ISOLADAS DE POOL DE CORAÇÕES, POR CITOMETRIA, DE MACHOS SHR NÃO-TRATADOS (N=9), MACHOS SHR TRATADOS COM EXTRATO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS POR VIA ORAL E INTRAPERITONEAL (N=9), E FÊMEAS SHR NÃO-TRATADAS (N=9).	51
FIGURA 10. CORTES HISTOLÓGICOS DE MACHOS SHR (A), MACHOS SHR TRATADOS (B) E FÊMEAS SHR (C). AS SETAS MOSTRAM ZONAS DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO.....	53

FIGURA 11. QUANTIFICAÇÃO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DE MACHOS SHR, MACHOS SHR TRATADOS E FÊMEAS SHR.....	54
FIGURA 12. AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA APÓS INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i>	56
FIGURA 13. FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS ISOLADOS DE <i>POOL</i> DE CORAÇÕES DE ANIMAIS INFECTADOS COM <i>T. CRUZI</i> (N=4).....	57
FIGURA 14. FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS ISOLADOS DE <i>POOL</i> DE CORAÇÕES DE ANIMAIS TRATADOS VIA ORAL COM EXTRATO CARDÍACO E INFECTADOS COM <i>T. CRUZI</i> (N=4).....	58
FIGURA 15. FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS ISOLADOS DE <i>POOL</i> DE CORAÇÕES DE ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE (N=4).	59
FIGURA 16. CORTES HISTOLÓGICOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS (A), CAMUNDONGOS INFECTADOS E TRATADOS (B) E CONTROLES (C). AS SETAS MOSTRAM ZONAS DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO.....	60
FIGURA 17. QUANTIFICAÇÃO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS (IIP), CAMUNDONGOS INFECTADOS E TRATADOS (EXT+IIP) E CONTROLES.	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS COMPARANDO MACHOS SHR E WISTAR, PAREADOS POR IDADE.	41
---	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

A insuficiência cardíaca é uma doença multissistêmica complexa e multifatorial caracterizada por distúrbios na fisiologia circulatória, acompanhada por inúmeras alterações estruturais e funcionais do miocárdio que afetam negativamente a capacidade do coração em bombear sangue para o corpo (Dunlay e Roger, 2014). A insuficiência cardíaca representa um importante problema de saúde pública que afeta mais de 23 milhões de pessoas em todo o mundo. (Dunlay e Roger, 2014). Doenças cardiovasculares são a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo (Organização Mundial Da Saude, 2010). No Brasil, são contabilizados 240.000 novos casos a cada ano, com 293.000 internações e mortalidade de 6%, segundo o Datasus (Ministerio Da Saude, 2007). A insuficiência cardíaca é mais prevalente em pacientes idosos, tendo 2/3 desses indivíduos idade maior que 65 anos (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatistica, 2006). No Brasil, há uma estimativa de aumento da população de idosos em cerca de seis vezes até o ano de 2040. Devido ao envelhecimento populacional, o aumento na longevidade e sobrevida desses pacientes, a prevalência da insuficiência cardíaca deverá aumentar de forma exponencial ao longo dos próximos 30 anos (Rosamond *et al.*, 2008; Dunlay e Roger, 2014). Um infarto do miocárdio ou a administração de um agente quimioterápico pode ser um evento desencadeador de um desequilíbrio na função cardíaca (Altara *et al.*, 2015). A insuficiência cardíaca pode também ser resultante de fatores que atuam a médio-longo prazo, como hipertensão, doença coronariana, doença valvular, diabetes, predisposição genética, fatores ambientais e doenças infecciosas, como a doença de Chagas (Altara *et al.*, 2015).

A patogênese da insuficiência cardíaca engloba mecanismos celulares e moleculares que afetam a biologia miocárdica e desencadeiam hipertrofia dos cardiomiócitos, disfunção e morte celular. (Moser e Hebert, 1996). Esse

processo patológico de adaptação é denominado de remodelamento cardíaco. O remodelamento cardíaco pode ser definido como a resposta adaptativa a estímulos de lesão ou aumento de carga que afeta a expressão gênica e que resulta em mudanças moleculares, celulares e intersticiais, manifestando-se clinicamente como alterações no tamanho, forma e função do coração (Cohn *et al.*, 2000). Em condições fisiológicas, o coração consegue manter um débito cardíaco normal por meio de um mecanismo que compensa qualquer aumento de demanda, adaptando a contração muscular no miocárdio (Cohn *et al.*, 2000). Em resposta ao aumento do estresse local e do aumento da carga hemodinâmica, alterações adaptativas são desencadeadas com ativação do sistema nervoso simpático, mudanças na matriz extracelular e na vascularização tecidual (Yamasaki *et al.*, 2003). A combinação desses processos adaptativos incapazes de resolver o estímulo inicial acaba por promover disfunção na contração e relaxamento dos ventrículos, acúmulo de regiões de fibrose e rarefação vascular, o que causa instabilidade no quadro (Yamasaki *et al.*, 2003). Com a permanência prolongada desses estímulos, também ocorre a morte celular de cardiomiócitos, o que, devido a sua capacidade apenas hipertrófica e não hiperplásica, acaba por limitar a sua regeneração (Laroumanie *et al.*, 2014). A capacidade regenerativa do tecido cardíaco de mamíferos está limitada ao período pós-natal imediato. Nessa fase, pode-se observar a geração de novos cardiomiócitos a partir de pré-existentes, o que permite que a arquitetura miocárdica seja restaurada após, por exemplo, uma cirurgia de ressecção do ápice de um ventrículo (Porrello *et al.*, 2011). Essa capacidade regenerativa também protege camundongos filhotes de 1 dia de vida de danos provocados por uma lesão de isquemia-reperfusão e previne o surgimento da disfunção cardíaca (Porrello *et al.*, 2013). No entanto, essa habilidade de regeneração se perde no 7º dia de vida de camundongos, ao ocorrer uma redução na transcrição dos fatores que regulam o ciclo celular e um aumento dos fatores de inibição sobre proliferação de cardiomiócitos (Mahmoud *et al.*, 2013; Porrello *et al.*, 2013).

Apesar da limitada capacidade regenerativa, a plasticidade de cardiomiócitos é bastante notável. A resposta hipertrófica do músculo cardíaco

visa equilibrar as pressões das câmaras cardíacas, normalizar o estresse nas paredes do coração, potencializando seu poder hemodinâmico com um consumo menor de oxigênio (Maillet *et al.*, 2013). A hipertrofia fisiológica pode ser constatada após um aumento de demanda, como observado na gravidez, e no condicionamento físico através do treinamento com exercícios (Maillet *et al.*, 2013). Por outro lado, quando há redução na carga hemodinâmica ou demanda metabólica, o coração pode mostrar um estado de atrofia, como ocorre em pacientes acamados com lesão da medula espinhal (Hill e Olson, 2008). Outro exemplo interessante da capacidade adaptativa do coração pode ser constatado em um estudo com cobras Pítons birmanesas, que após uma grande refeição mostram um aumento de 40% na massa cardíaca e de 50% no volume de ejeção em um período de 48 horas (Riquelme *et al.*, 2011). A medida que a refeição é digerida ao longo de dias, seus parâmetros vão voltando aos valores iniciais. Apesar das diferenças com o sistema cardiovascular humano, o aumento na massa cardíaca ocorre, nesse caso também, por meio da hipertrofia (e não hiperplasia) de cardiomiócitos (Riquelme *et al.*, 2011). Esse processo está associado ao aumento na expressão de proteínas contráteis e ativação da via PI3K/ Akt/ mTOR, além de ser mecanicamente conduzida pelo aumento dos ácidos graxos livres circulantes, consequente ao aumento da reabsorção e oxidação de ácidos graxos no miocárdio (Riquelme *et al.*, 2011).

Na fisiologia normal, a hipertrofia mantém a função contrátil normal e o relaxamento ventricular apropriado. A deposição de colágeno na matriz do miocárdico não é observada e a densidade capilar aumenta em proporção ao aumento da massa miocárdica. Além disso, também observam-se alterações bioenergéticas favoráveis, como o metabolismo aumentado de ácidos graxos e biogênese mitocondrial. A expressão de um grupo de genes denominados de "programa genético fetal" é apenas observada na hipertrofia patológica (Maillet *et al.*, 2013). Durante o crescimento hipertrófico do miocárdio, além do estímulo a expressão de proteínas contráteis, estruturais e relacionadas a vias metabólicas, ocorre a modificação na expressão de certas proteínas contráteis para isoformas de padrão fetal e a re-expressão de proteínas do programa

genético fetal (Swynghedauw, 1999). A hipertrofia fisiológica se caracteriza tipicamente por um aumento de 10% a 20% no miocárdio e regride sem sequelas permanentes após o término do aumento provisório sobre demanda hemodinâmica (Fagard *et al.*, 1983). A indução de hipertrofia fisiológica pelo treinamento por exercício ou através da manipulação de moléculas de vias de sinalização de crescimento cardíaco apresenta um potencial de amenizar a hipertrofia patológica da insuficiência cardíaca (Scheuer *et al.*, 1982). A hipertrofia cardíaca fisiológica desenvolvida em resposta ao exercício está associada ao fator de crescimento similar a insulina (IGF-1 - *insulin-like growth factor*). O IGF-1 pode ser encontrado em níveis aumentados em atletas treinados e em cardiomiócitos sob estresse hemodinâmico (Neri Serneri *et al.*, 2001). Um estudo interessante mostrou a necessidade da sinalização do IGF-1 para a indução de hipertrofia através do exercício, tendo sido observada a supressão completa da resposta hipertrófica à natação em camundongos com ablação de receptores de IGF-1 em cardiomiócitos (Kim *et al.*, 2008). Em contraste, a ablação desses receptores de IGF-1 exacerba a hipertrofia patológica, sugerindo uma maior propensão à descompensação na ausência desse mecanismo fisiológico de sinalização para hipertrofia (Boudina *et al.*, 2009). O estímulo induzido experimentalmente à expressão cardíaca de IGF-1 inicialmente produz hipertrofia ventricular funcionalmente compensada que evolui ao longo do tempo para hipertrofia patológica com disfunção sistólica e fibrose (DeLaughter *et al.*, 1999).

1.1.1. Classificações da Insuficiência Cardíaca

A estratificação de pacientes com insuficiência cardíaca é relativamente simples e está baseada em dados de seguimento histórico, permitindo estabelecer de forma mais clara estratégias adequadas de tratamento, de recomendações para melhoria da qualidade de vida e estimativas mais precisas sobre o prognóstico. De acordo com a história natural da insuficiência cardíaca, sua apresentação inicial é caracterizada pela presença de fatores de risco, como hipertensão ou diabetes. Aos poucos, a permanência de fatores de risco pode acarretar mudanças estruturais no coração, como a hipertrofia

ventricular esquerda ou o déficit no relaxamento miocárdico. Com o agravamento, sintomas podem surgir e progredir, instaurando uma insuficiência cardíaca sintomática. A fase final dessa síndrome é a falência múltipla de órgãos e morte (Mcmurray *et al.*, 2012). A insuficiência cardíaca atualmente é classificada em estágios de acordo com a fase de sua progressão. A mais recente diretriz de insuficiência cardíaca da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Bocchi *et al.*, 2009) estabelece uma categorização conforme segue abaixo:

- Estágio A: alto risco de desenvolver insuficiência cardíaca, sem doença estrutural detectável ou sintomas.
- Estágio B: doença cardíaca estrutural, mas sem sinais ou sintomas de insuficiência cardíaca.
- Estágio C: doença cardíaca estrutural com sintomas prévios ou atuais de insuficiência cardíaca.
- Estágio D: insuficiência cardíaca refratária ao tratamento que requer intervenções especializadas.

Adicionalmente, a insuficiência cardíaca crônica é categorizada também pela intensidade de sintomas apresentados, proposta pela *New York Heart Association* (NYHA) (Bocchi *et al.*, 2009). Essa classificação estratifica de acordo com o grau de esforço necessário para provocar sintomas, com o objetivo de definir a limitação física dos pacientes sobre atividades cotidianas e de fazer uma estimativa sobre sua qualidade de vida, conforme segue abaixo:

- Classe I: ausência de sintomas durante atividades cotidianas. A limitação aos esforços é semelhante à de indivíduos normais;
- Classe II: sintomas desencadeados por atividades cotidianas;
- Classe III: sintomas desencadeados por atividades menos intensas que as cotidianas, ou aos pequenos esforços;
- Classe IV: sintomas em repouso.

Dos métodos de imagem para avaliação, o ecocardiograma é um dos mais utilizados e tem importante contribuição para o diagnóstico da insuficiência

cardíaca. Uma avaliação ecocardiográfica pode prover informações úteis sobre estruturas e função do coração (motilidade das paredes, alterações valvulares, função do ventrículo direito, pericárdio e pressão de artéria pulmonar), podendo sugerir a etiologia, como alterações da contratilidade segmentar na cardiopatia isquêmica, a hipertrofia ventricular concêntrica na cardiopatia hipertensiva, e hipertrofias assimétricas na cardiomiopatia hipertrófica (Nagueh *et al.*, 2009). Pode também detectar alterações em pacientes assintomáticos, como um déficit no relaxamento ventricular característico da disfunção diastólica. Com base na avaliação ecocardiográfica combinada com a apresentação de sinais e sintomas, é possível classificar a insuficiência cardíaca de maneira bastante precisa (Lang *et al.*, 2005; Nagueh *et al.*, 2009), conforme segue abaixo:

- Classe I: disfunção diastólica subclínica (assintomática), sem hipertrofia ventricular esquerda.
- Classe II: hipertrofia ventricular esquerda,
 - IIA: com capacidade funcional normal (classe I da NYHA).
 - IIB: com capacidade funcional anormal (classe II –IV da NYHA).
- Classe III: insuficiência cardíaca sintomática com fração de ejeção preservada.
- Classe IV: insuficiência cardíaca sintomática com fração de ejeção reduzida.

De forma simplificada, o tratamento da insuficiência cardíaca é baseado no controle dos fatores que englobam a síndrome e suas manifestações, como o controle da pressão arterial, da frequência cardíaca, da volemia e da oxigenação do miocárdio. O tratamento também busca reduzir a carga pressórica nas câmaras cardíacas durante o exercício e repouso e o *déficit* de relaxamento ventricular (Bocchi *et al.*, 2009). A permanência da hipertensão arterial exerce efeito deletério na função ventricular e promove alterações estruturais e funcionais. A revascularização miocárdica pode ser uma opção terapêutica para aliviar um processo isquêmico no miocárdio que prejudica o relaxamento ventricular. A frequência cardíaca elevada (taquicardia) encurta o tempo de enchimento/ relaxamento ventricular (diástole) e reduz o tempo de

perfusão coronária e o aporte de oxigênio ao miocárdio, explicando o benefício da administração de drogas beta-bloqueadoras (Bocchi *et al.*, 2009).

1.2. CARDIOMIOPATIA HIPERTENSIVA

A hipertensão é o segundo fator de risco mais comum para insuficiência cardíaca, abaixo apenas da doença coronariana, e afeta mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (Levy *et al.*, 1996; Mendis *et al.*, 2007). Cerca de 1/4 dos novos casos de insuficiência cardíaca estão associados a doença cardíaca hipertensiva (Kannel e Cobb, 1992). Em idosos, cerca de 68% dos casos de insuficiência cardíaca estão ligados a hipertensão. Estudos na atenção primária indicam que 3 em cada 5 pacientes diagnosticados com insuficiência cardíaca possuíam hipertensão prévia (Yamasaki *et al.*, 2003). A doença cardíaca hipertensiva engloba um amplo espectro de manifestações, variando desde o remodelamento ventricular assintomático a insuficiência cardíaca sintomática (figura 1). De forma precoce, alguns sinais clínicos podem identificar a presença da doença cardíaca hipertensiva, como a presença de disfunção diastólica no ventrículo esquerdo, o alargamento do átrio esquerdo e a manifestação de arritmias atriais. Eventos isquêmicos podem ser também resultantes da hipertensão, podendo acelerar a progressão e piora da doença cardíaca hipertensiva (Zabalgaitia *et al.*, 2001; Drazner, 2011). Com o agravamento dessa doença, pode-se constatar um aumento das dimensões do ventrículo esquerdo, uma redução importante no desempenho sistólico e a manifestação de arritmias ventriculares, além de um risco aumentado de fibrilação atrial e morte súbita (Haider *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 2013).

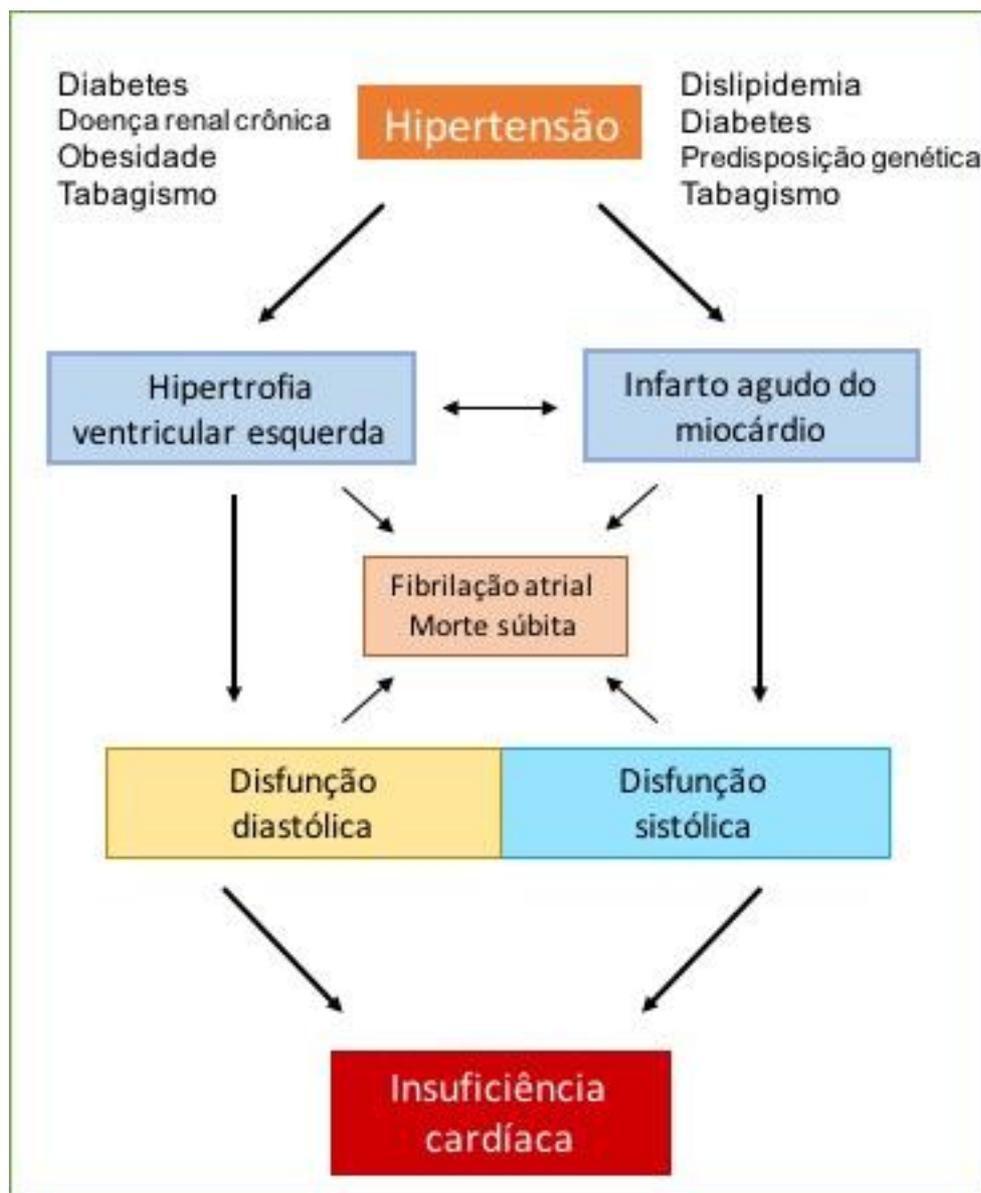


Figura 1. Diagrama ilustrativo que mostra a progressão da doença cardíaca hipertensiva e suas complicações cardiovasculares.

O estudo “Dallas Heart”, realizado com indivíduos hipertensos e normotensos de 30 a 67 anos de idade, observou que a prevalência de hipertrofia ventricular esquerda, avaliada por ressonância cardíaca, foi de 9,4%, tendo sido maior nos participantes com pressão arterial sistólica elevada (Drazner *et al.*, 2005). No estudo multiétnico de aterosclerose (MESA), realizado com homens e mulheres de meia-idade e idosos sem diagnóstico prévio de doença cardiovascular (incluindo hipertensão), a prevalência de

hipertrofia ventricular esquerda, avaliada também por ressonância cardíaca, foi de 11% (Jain *et al.*, 2010). Ambos estudos são bastante interessantes pois se propuseram a detectar com ressonância magnética cardíaca, que é um dos métodos de imagem disponíveis mais precisos, a presença de hipertrofia ventricular esquerda em uma população adulta em geral.

Dependendo do teste diagnóstico utilizado (eletrocardiograma, ecocardiograma ou ressonância magnética cardíaca), as estimativas de hipertrofia ventricular esquerda entre hipertensos pode variar bastante. Em uma análise mais ampla de estudos que utilizaram eletrocardiograma como teste diagnóstico, a prevalência da hipertrofia ventricular esquerda variou de 0,6% a 40% (média de 24% em homens e 16% em mulheres) (Cuspidi, Rescaldani, *et al.*, 2012). Em outra análise, estudos utilizando ecocardiografia para a detecção de hipertrofia ventricular esquerda mostraram taxas de prevalência menos variáveis, entre 36% a 41% em pacientes hipertensos (Cuspidi, Sala, *et al.*, 2012).

Manter níveis elevados da pressão arterial pode provocar diversos eventos adversos, como a hipertrofia e reprogramação de genes em cardiomiócitos, ativação de fibroblastos cardíacos, fibrose intersticial e perivascular (Drazner, 2011). Estas alterações conduzem a mudanças restritivas na geometria global do coração e podem progredir até a falência cardíaca com a incapacidade de atender adequadamente demandas energéticas e de oxigenação do corpo. Apesar dos inúmeros avanços no tratamento da hipertensão (Guo *et al.*, 2012), a doença cardíaca hipertensiva ainda representa um distúrbio bastante relevante e que tem crescido junto ao envelhecimento da população (Liu *et al.*, 2013).

A hipertensão sistêmica crônica tem como uma de suas características a ativação de uma complexa cadeia neuro-humoral que, eventualmente, irá afetar o funcionamento de cardiomiócitos, da matriz extracelular cardíaca, com acúmulo de colágeno e fibrose intersticial, e da microvasculatura intramiocárdica. Os principais estímulos capazes de ativar uma ampla gama de sinalização no miocárdio são o estresse biomecânico e o estresse neuro-

humorais. Alguns mecanismos disparados por esses estímulos são a ativação de canais iônicos sensíveis a estiramento, integrinas e outras proteínas estruturais que fazem parte de uma rede complexa de interações entre matriz extracelular e componentes intracelulares, como citoesqueleto, sarcômeros e proteínas carreadoras de íons Ca^{2+} , que acabam por sinalizar um aumento na expressão de genes ligados a hipertrofia e síntese proteica, que em última instância resulta no aumento do tamanho de cardiomiócitos (figura 2).

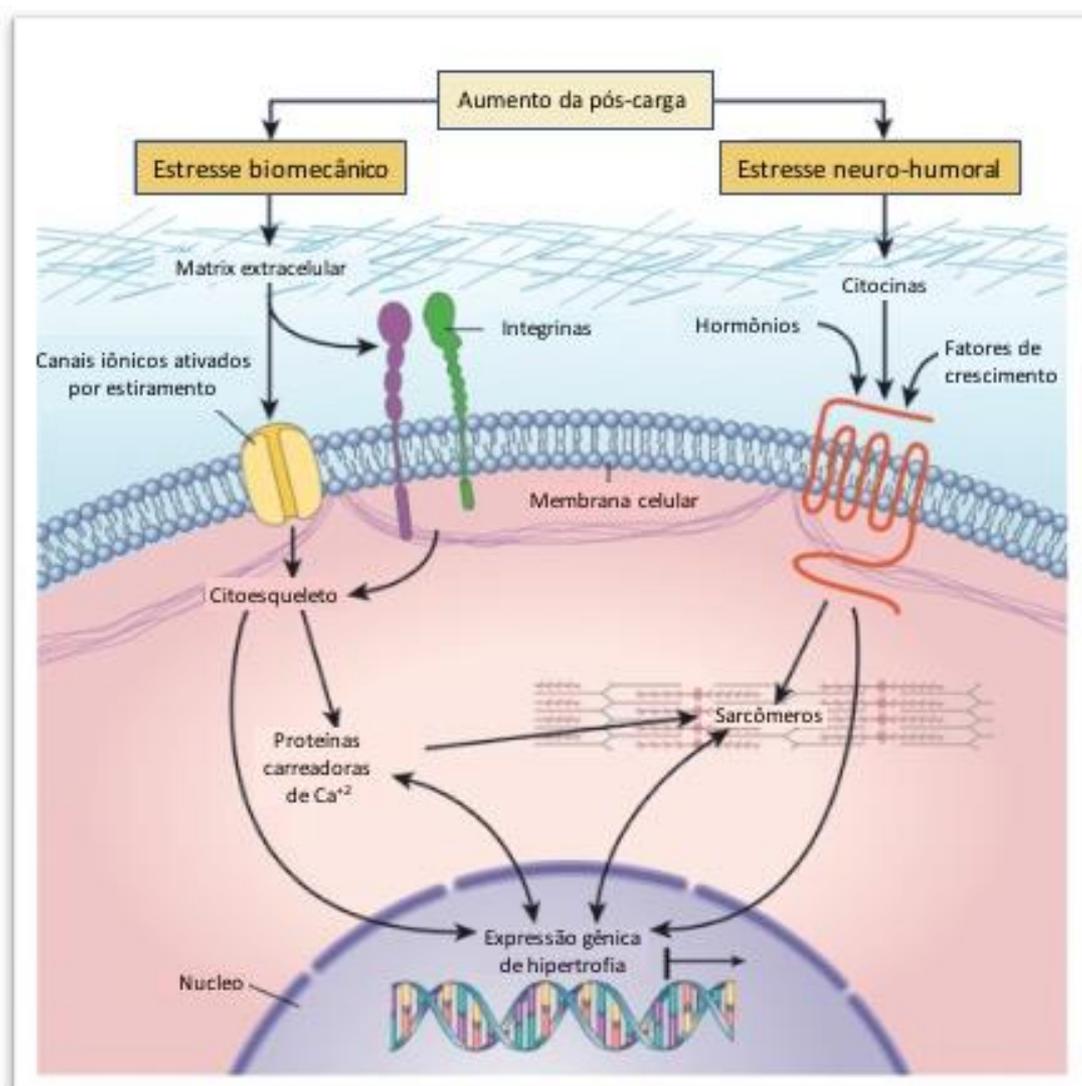


Figura 2. Ilustração sobre a interação complexa entre estresse mecânico (hemodinâmico) e estresse neuro-humoral, e as vias principais para estímulo a expressão de genes hipertróficos (Hill e Olson, 2008).

1.2.1. Modelo experimental de ratos espontaneamente hipertensos

O modelo genético de hipertensão experimental que utiliza ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats* – SHR) é o modelo experimental animal que mais se assemelha à hipertensão primária em humanos. Esse modelo consegue representar o desenvolvimento da doença cardíaca hipertensiva a partir do estabelecimento precoce da hipertensão arterial sistêmica no início da vida adulta, que progride até insuficiência cardíaca descompensada.

Os mecanismos afetados nesse modelo ainda estão sob investigação mas sabe-se que esse modelo apresenta alterações de funcionalidade em sistemas reguladores da pressão arterial (Okamoto e Aoki, 1963), como a diminuição significativa da sensibilidade barorreflexa em animais SHR com 4-5 semanas de vida (Andresen e Yang, 1989; Head, 1994) e o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina, que está relacionado à hipertrofia e hiperplasia de células cardíacas e vasculares (Griendling *et al.*, 1993). Animais SHR machos desenvolvem hipertensão aos 3 meses de idade. A partir dos 5 meses de idade, pode ser constatado a hipertrofia ventricular esquerda e, após 16 meses de idade, insuficiência cardíaca evidente (McCune *et al.*, 1990; Hohl *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1997; Doggrell e Brown, 1998). Os níveis de noradrenalina, renina, aldosterona e atriopeptina circulantes estão elevados (McCune *et al.*, 1990) e existem algumas anormalidades estruturais cardíacas como hipertrofia biventricular, alargamento de miócitos e aumento da fibrose intersticial (Ruben *et al.*, 1984). A avaliação ecocardiográfica mostra hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo em animais SHR machos aos 12 meses de idade (Haas *et al.*, 1995).

Apesar de extensivamente estudada, a patogênese da hipertensão ainda não está completamente desvendada (Marvar *et al.*, 2009; Marvar *et al.*, 2012). É um distúrbio multifatorial complexo onde existe a interação de diversos mecanismos fisiopatológicos que interferem na autorregulação da pressão arterial e na função do endotélio vascular. Evidências recentes têm

sugerido que a inflamação e o sistema imune adaptativo possuem impacto significativo sobre o desenvolvimento da hipertensão em modelos animais (Harrison *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2011). Os primeiros achados indicam o aumento da reatividade imune na hipertensão, incluindo a detecção de anticorpos anti-timócitos em SHRs (Takeichi *et al.*, 1981). Além disto,, a hipertensão apresenta melhora com a administração de drogas imunossupressoras, como a 6-mercaptopurina e a ciclofosfamida (Bataillard *et al.*, 1989; Dzielak, 1991). Estudos mais recentes têm demonstrado que camundongos que não possuem linfócitos (Rag1^{-/-}) são resistentes a diversas formas de hipertensão experimental (Guzik *et al.*, 2007; Marvar *et al.*, 2009). No entanto, com a transferência adotiva de linfócitos T, mas não de células B, o fenótipo hipertensivo é restaurado (Marvar *et al.*, 2009). Estes estudos experimentais mostraram também que estímulos hipertensivos, tais como angiotensina II e altas concentrações de sal na dieta, estimulam a ativação de linfócitos T e a migração de células T ativadas para os vasos sanguíneos periféricos e rins. Os linfócitos T, por sua vez, liberam citocinas pró-inflamatórias que estimulam a vasoconstrição e a retenção de sódio, produzindo um mecanismo de *feedback* hipertensivo (Guzik *et al.*, 2007; Crowley *et al.*, 2010; De Miguel *et al.*, 2010).

Dessa forma, diversos estudos têm evidenciado a grande importância do sistema imune inato e adaptativo na interação com o desenvolvimento de cardiomiopatia. As respostas imuno-mediadas a estímulos externos também podem promover dano cardíaco, como por exemplo ocorre na doença de Chagas.

1.3. CARDIOMIOPATIA NA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma doença tropical que resulta da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que pode causar miocardite e pericardite aguda; e, de forma crônica, miocardite fibrosante. Estima-se que aproximadamente 10 milhões de indivíduos sejam afetados em todo o mundo. A miocardite chagásica é a causa mais comum de cardiomiopatia não-

isquêmica na América Latina. (Rassi *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, no Brasil, a transmissão oral pelo *Trypanosoma cruzi* tornou-se a causa mais frequente de infecção aguda da doença de Chagas (Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012; Coura, 2015). Com base na crescente incidência da infecção oral aguda, o consumo de alimentos contaminados se tornou uma das práticas mais comuns associadas ao contágio nas regiões da Amazônia, Caribe e Andes (Noya *et al.*, 2015). A mortalidade na fase aguda ocorre em menos de 10% dos casos sintomáticos, tendo como causa uma miocardite aguda grave ou uma meningoencefalite. A resposta na fase aguda da doença de Chagas, quando adquirida por via oral, se apresenta de maneira mais intensa (De Meis *et al.*, 2013) e pode ser resultado de uma via alternativa de inoculação do parasita (oral) e características do hospedeiro, como composição genética e resposta inatas e adaptativas inerentes ao sistema imune próprio (Andrade *et al.*, 2014; Cardillo *et al.*, 2015). Os motivos pelos quais casos agudos orais apresentem sintomas mais intensos e mortalidade mais elevada ainda permanece inexplicada. De maneira geral, a maioria das manifestações da doença de Chagas durante a fase aguda se resolvem espontaneamente, mesmo sem tratamento, e cerca de 2/3 desses pacientes nunca irão desenvolver a doença a médio e longo prazo. Os 1/3 restantes irão apresentar uma das formas de doença crônica, podendo ser uma manifestação cardíaca, digestiva (megaesôfago e megacólon), ou combinada, após 10-20 anos do primeiro contato com o parasita (Mady e Nacrueth, 1995; Malik *et al.*, 2015). Nos estágios mais avançados, além do componente sistólico, se torna mais evidente a disfunção diastólica com restrição no relaxamento atrial, com um aumento das câmaras do coração e enrijecimento de suas paredes pela fibrose. Além disso, é comum o surgimento de arritmias ventriculares, tromboembolismo pulmonar e valvopatias mitral e tricúspide (Marin-Neto *et al.*, 2007).

A manifestação crônica mais frequente da doença de chagas é a cardiomiopatia, que está associada a inflamação, lise de miócitos e extensa fibrose na matriz extracelular. Cerca de 20-30% dos indivíduos infectados irão desenvolver essa cardiomiopatia crônica potencialmente fatal, que se torna

evidente e sintomática cerca de 10-20 anos após a infecção inicial (Malik *et al.*, 2015). O sistema imune inato e adaptativo têm papel fundamental no controle do crescimento do parasito durante a fase aguda da infecção, permitindo que o indivíduo sobreviva e, assim, se estabeleça a fase crônica da doença. A fase inicial de infecção com *T. cruzi* dura 4-8 semanas e a fase crônica persiste para a vida útil do hospedeiro (Dias *et al.*, 1956; Dias e Dias, 1968). A fase aguda normalmente se apresenta sem sintomas ou como uma doença febril auto-limitada. Os sintomas podem aparecer após 1 a 2 semanas da exposição ao parasita através da inoculação epidérmica de fezes de triatomíneos infectados, ou através de transfusão de sangue contaminado com o parasita. Tratamentos com fármacos antiparasitários, como o benzonidazol, são iniciados na tentativa de resolver a infecção aguda (Pinto *et al.*, 2009) e prevenir que a doença se torne crônica.

A patogênese da evolução para cardiopatia chagásica é complexa e multifatorial. Por um lado, pode ser observada uma resposta autoimune evidente justificada pelo mimetismo molecular entre determinantes antigênicos de *T. cruzi* e antígenos cardíacos (Saba *et al.*, 2013); por outro lado, estudos têm sugerido que a permanência do parasita no tecido cardíaco poderia justificar a persistência da inflamação, dano tecidual e desenvolvimento para cardiopatia crônica. Isso pode ser constatado em um estudo com camundongos normais imunizados com proteínas de parasito que desenvolveram alterações cardíacas, o que evidencia um componente imunorregulador antigênico na etiologia da miocardite chagásica (Leon *et al.*, 2003).

A patogênese da doença de Chagas é complexa e envolve inúmeros componentes, tanto intrínsecos com extrínsecos ao sistema imune, que podem levar a cardiomiopatia com destruição de cardiomiócitos e fibrose progressiva (Marin-Neto *et al.*, 2007). Danos sistêmicos e teciduais podem ser causados diretamente pelo *T. cruzi*, visto que antígeno e DNA do *T. cruzi* foram identificados no tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos; e, anticorpos T CD8+ anti- *T. cruzi* específicas podem ser isolados de biópsias endomiocárdicas de pacientes com cardiopatia chagásica. Por outro lado, o

DNA de *T. cruzi* (não o parasito íntegro), pode ser encontrado no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica sob a forma indeterminada e ativa (Silverio *et al.*, 2012). Adicionalmente, não há associação entre a presença de parasitas amastigotas em células miocárdicas e respostas inflamatórias locais. Alguns estudos apontam para o envolvimento de reações autoimunes na patogênese da cardiomiopatia chagásica (Marin-Neto *et al.*, 2007). Após a infecção por *T. cruzi*, uma série de eventos podem ser desencadeados como a exposição ao antígeno cardíaco secundária a dano tecidual, seguida por sensibilização antigênica e mimetismo molecular, onde linfócitos T e B reconhecem antígenos parasitários que compartilham epítomos estruturalmente semelhantes a antígenos do hospedeiro, o que pode gerar respostas de reação cruzada, de natureza autoimune, juntamente com ativação policlonal que leva à produção de autoanticorpos relacionados (Fernandez *et al.*, 2014). Após o início de uma infecção aguda, a grande concentração de parasitos no tecido leva a uma intensa resposta da imunidade celular e humoral, que se traduz em uma resposta fisiológica na tentativa de combater o *T. cruzi* mas não é suficiente para eliminar o parasito por completo. A ativação de macrófagos e células dendríticas promove a endocitose dos parasitas teciduais, o que leva a expressão de interleucina -12 e de outras moléculas capazes de estimular linfócitos T específicos para o *T. cruzi*, os quais migram localmente e participam da resposta imune tecidual contra o parasita (Cardillo *et al.*, 2015).

Ao se extrair linfócitos T CD4+, ou linfócitos T, de camundongos cronicamente infectados por *T. cruzi* e transferir para camundongos geneticamente idênticos não-infectados é observada a indução de um processo inflamatório no tecido miocárdico. Ao analisar linfócitos T CD4+ de camundongos infectados por *T. cruzi*, notou-se que estes reconhecem a miosina cardíaca, mas não outras proteínas cardíacas como a actina. De forma complementar, ao se induzir tolerância a partir de um homogenato de proteínas cardíacas enriquecido com miosina se evidencia uma miocardite de menor intensidade com fibrose reduzida (Marin-Neto *et al.*, 2007)..

Na fase aguda, pode ser observado que a infecção em modelos experimentais promove uma ativação policlonal de células T e B em órgãos linfoides periféricos que permanece até a fase crônica (Minoprio *et al.*, 1986; Da Silva *et al.*, 1998). Os linfócitos B, além de produzirem anticorpos reativos a infecção chagásica, também são encontrados durante a fase crônica, podendo influenciar diretamente a função de linfócitos T (Fernandez *et al.*, 2014). Células T CD8+ têm grande importância na doença de chagas e principalmente no desenvolvimento da cardiopatia, induzindo morte celular de cardiomiócitos infectados e promovendo danos ao tecido cardíaco. O potencial destrutivo de linfócitos T CD8+ depende também da prevalência de seus perfis de ativação, podendo produzir IFN- γ ou perforina, a qual se associa a toxicidade celular em modelos murinos (Silverio *et al.*, 2012).

Na fase crônica, com o desenvolvimento da insuficiência cardíaca chagásica pode se encontrar níveis aumentados de células T CD8+ e TCD4+ no miocárdio, com predomínio de células T CD8+ (Rocha Rodrigues *et al.*, 2012; Arguello *et al.*, 2014). Em pacientes crônicos, também podem ser achados no tecido cardíaco linfócitos T ativados duplo-positivos (CD4+ e CD8+), podendo essas células apresentar um perfil efetor com característica autoreativa (Giraldo *et al.*, 2011). Além disso, a resposta local no miocárdio exibe um perfil de citocinas Th1, com elevação na expressão gênica de IFN- γ e IL-18, e que se correlacionam com dilatação ventricular (Rocha Rodrigues *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2014). Os níveis circulantes de IFN- γ também estão elevados durante a doença de Chagas crônica e estão inversamente correlacionados à fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Guedes *et al.*, 2012). O aumento na expressão de IL-17 em linfócitos T em pacientes que apresentam a forma indeterminada da doença se associa a uma melhor função cardíaca, que pode ser um marcador preditivo de proteção contra um possível dano cardíaco (Magalhaes *et al.*, 2013). Em contrapartida, pacientes portadores de insuficiência cardíaca associada a doença de Chagas apresentam proporções reduzidas de células T reguladoras no miocárdio (Arguello *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2014). A redução da atividade de linfócitos T reguladores circulantes na cardiomiopatia moderada ou grave mostra relação direta com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Guedes

et al., 2012). Um estudo interessante conseguiu reduzir sintomas da doença de Chagas a partir de um modelo de vacinação que induz a ativação prévia de linfócitos T CD8+ com antígenos do parasita, minimizando danos aos tecidos e menor incidência de manifestações crônicas em camundongos (Dos Santos Virgilio *et al.*, 2014).

1.4. O SISTEMA IMUNE NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Nos últimos 20 anos, a participação do sistema imune em doenças cardiovasculares não-imunomediadas tem sido reconhecida como importante em sua manutenção e piora progressiva. Interações entre células do sistema imune inato e adaptativo com macrófagos residentes podem ser observados na adventícia de vasos sanguíneos e na matriz extracelular do tecido cardíaco (Harrison *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2012). Métodos de rastreamento e detecção precoce que possam identificar os pacientes com insuficiência cardíaca ao longo de um curso inicial assintomático da doença representariam crucial importância no combate à epidemia atual de insuficiência cardíaca. Métodos utilizando detecção de marcadores inflamatórios relevantes permitiriam iniciar a intervenção terapêutica de maneira antecipada, além de aumentar a eficácia dos tratamentos ao permitir um melhor entendimento sobre mecanismos moleculares envolvidos. A detecção de moléculas associadas a disfunção ventricular esquerda em estágio precoce são promissoras, como MIG/CXCL9 (monoquina induzível por interferon- γ), I-TAC/CXCL11 (células T α -quimioatrativas induzíveis por interferon- γ) e IP10 (proteína induzida por interferon γ) (Altara *et al.*, 2015). Até o momento, os mecanismos responsáveis pela progressão do remodelamento cardíaco e, por conseguinte, pela transição de coração hipertrófico para funcionalmente insuficiente ainda permanecem desconhecidos. Diversos estudos têm evidenciado mecanismos envolvendo inflamação na progressão da insuficiência cardíaca crônica.

A proteína C reativa é um preditor independente de desfechos adversos em pacientes com insuficiência cardíaca aguda ou crônica (Braunwald 2008). O desequilíbrio na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a interleucina (IL) - 10,

respectivamente, é relacionado ao desenvolvimento e agravamento da insuficiência cardíaca (Kaur *et al.*, 2009). Níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios circulantes, como o TNF- α e a IL-6. (Levine *et al.*, 1990; Bozkurt *et al.*, 2010), também se correlacionam de forma independente à deterioração da função cardíaca em portadores de insuficiência cardíaca. O TNF- α e a IL-6 apresentam efeitos biológicos na contratilidade cardíaca e remodelação capazes de explicar alguns aspectos da síndrome de insuficiência cardíaca (Dahl *et al.*, 2009). Mais recentemente, o aumento percentual de linfócitos T CD4+ na circulação foi correlacionada positivamente com a presença de disfunção ventricular esquerda em paciente com insuficiência cardíaca (Fukunaga *et al.*, 2007). Na conclusão desse estudo, o autor sugere que tratamentos que visem a prevenir a ativação dessa subpopulação indesejada e potencialmente prejudicial de linfócitos T CD4+ poderiam representar um novo alvo terapêutico em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (Fukunaga *et al.*, 2007).

A importância do sistema imune adaptativo tem se mostrado relevante na patogênese de doenças cardíacas inflamatórias, como na miocardite. No modelo experimental de miocardite autoimune, linfócitos T e células dendríticas parecem ser participantes obrigatórios na resposta autoimune de dano tecidual, especialmente cardíaco (Eriksson *et al.*, 2003). Nesse contexto, células dendríticas possuem a habilidade de ingerir antígenos externos e apresentá-los por meio de complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) para induzir respostas de linfócitos T CD4+. Quando realizada a transferência adotiva de linfócitos T purificados de camundongos com miocardite ativa para controles, os animais receptores desenvolveram a mesma doença inflamatória miocárdica (Smith e Allen, 1991), o que sugere a capacidade de linfócitos T CD4+ ativados em promover inflamação local e disfunção cardíaca (Avlas *et al.*, 2011). Embora doenças inflamatórias miocárdicas sejam conhecidas pela indução de um estado crônico de cardiomiopatia, a infiltração esparsa de células inflamatórias pode ser comumente observada em doenças miocárdicas não-inflamatórias (Weber, 2005). Mecanismos inflamatórios contribuem cronicamente para o

desenvolvimento de cardiomiopatia através do lento e progressivo dano cardíaco tecidual, mudanças na arquitetura miocárdica e indução de reatividade autoimune (Mann, 2002). A depleção de macrófagos em ratos hipertensos, juntamente com um aumento na infiltração de linfócitos T CD4+, promove uma aceleração no desenvolvimento de cardiomiopatia (Zandbergen *et al.*, 2009).

Achados recentes mostram que a resposta inflamatória em tecidos do miocárdio desempenha um papel importante no remodelamento ventricular esquerdo hipertensivo. Áreas de fibrose miocárdica estão relacionadas a densidade de macrófagos intersticiais infiltrados, linfócitos T CD4 + e linfócitos T CD8+ em ratos hipertensos (Hinglais *et al.*, 1994; Nicoletti *et al.*, 1996). Mastócitos têm a capacidade de promover hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose intersticial através da síntese e secreção de TNF- α , o que contribui para a hipertrofia ventricular que piora progressivamente até insuficiência cardíaca (Shiota *et al.*, 2003).

Estudos com os modelos experimentais de constrição da Aorta abdominal renal (Shioi *et al.*, 1997) e de ratos Dahl hipertensos sensíveis ao sal (Kuwahara *et al.*, 2004) apontaram que a infiltração de macrófagos e a expressão de IL-1 β e da proteína quimiotática de monócitos (MCP) - 1 estavam ligadas à presença de fibrose cardíaca e disfunção diastólica cardíaca. Um interessante estudo clínico em pacientes hipertensos com hipertrofia ventricular esquerda mostrou níveis plasmáticos aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β . No entanto, esse aumento não foi constatado em pacientes hipertensos sem dano a órgãos-alvo, como cérebro, coração e rins (Jastrzebski *et al.*, 2006). Além disso, camundongos transgênicos para superprodução de TNF- α demonstram um aumento do tamanho das células cardíacas, câmara ventricular expandida e fibrose miocárdica franca com o envelhecimento. Em camundongos *knockout* para TNF- α foi observada uma redução na hipertrofia miocárdica, fibrose intersticial, apoptose miocárdica e atividade de MMP-9 (Sivasubramanian *et al.*, 2001; Janczewski *et al.*, 2003).

Apesar da ativação imuno-inflamatória ser apontada como prejudicial, a inflamação é parte fundamental dos processos de reparo do corpo. Caso uma inibição indiscriminada seja provocada, isso pode resultar em danos amplos para mecanismos de recuperação em diversos sistemas fisiológicos, como o sistema cardiovascular. Estratégias terapêuticas contra alvos inflamatórios, como etarnecept (anti- TNF- α), foram testadas em grandes ensaios randomizados e não foram capazes de mostrar benefício sobre o estado clínico dos pacientes, taxa de morte ou de hospitalização por insuficiência cardíaca (Mann *et al.*, 2004). Um importante estudo com uma coorte grande (Chung *et al.*, 2003) mostrou que o infliximab (anti- TNF- α) em altas doses provocou efeitos adversos em pacientes com insuficiência cardíaca moderada-grave. Apesar de inúmeros ensaios clínicos com resultados decepcionantes, algumas abordagens mais amplas de modulação do sistema imuno-inflamatório, como a terapia com imunoglobulina intravenosa, parecem ser mais promissoras, mas os resultados ainda são pouco consistentes (Torre-Amione *et al.*, 2008; Gullestad *et al.*, 2013).

1.5. TOLERANCIA ORAL

A tolerância oral pode ser definida como um estado de hiporresponsividade sistêmica a um antígeno previamente administrado por via oral. Diversos mecanismos estão envolvidos e podem afetar a indução da tolerância oral; alguns deles relacionados ao antígeno e alguns relacionados ao animal, estando vinculado a uma interação complexa de estruturas organizadas da mucosa e compartimentos linfóides, cooperando de forma a gerar respostas tolerogênicas. (Faria e Weiner, 2005)

O início dos estudos da tolerância imunológica induzida por via oral tem origem a partir de modelos de indução de reações de anafilaxia. Na primeira década do século XX, o fenômeno de inibição imune por via oral foi descoberto ao acaso por dois pesquisadores de forma independente. Em 1909, Alexander Besredka, (Besredka, 1909), que trabalhava no Instituto Pasteur, estudando maneiras de prevenir reações de anafilaxia em cobaias percebeu que a

indução de um estado anafilático era evitada pela administração prévia de doses muito baixas por via intravenosa, retal ou oral de uma substância sensibilizante, independentemente se fosse leite, ovoalbumina ou soro. Em 1911, H. Gideon Wells (Wells, 1911) ao investigar a anafilaxia a proteínas vegetais no laboratório de patologia na Universidade de Chicago, observou que quando trocou a ração para uma que continha milho em sua composição, seus animais não mais desenvolviam anafilaxia a proteínas do milho.

Passados 30 anos, Merrill Chase mostrou que a hipersensibilidade do tipo tardia à tuberculina podia ser passada de um animal para outro, por meio da transferência de seus leucócitos (Chase, 1946a). Em seguida, mostrou que leucócitos colhidos de animais sensibilizados para a dermatite de contato por pincelagem da pele com cloreto de picrila ou dinitrofluorobenzeno, podiam também transferir essa "sensibilidade de contato" para animais saudáveis. O interessante dessa sequência de experimentos é que o levou a observação intrigante sobre a não reatividade por animais que tiveram contato por via oral com o agente sensibilizante previamente a indução da dermatite de contato com cloreto de picrila ou dinitrofluorobenzeno (Chase, 1946b).

Segundo a teoria do imunologista australiano Frank Mcfarlane Burnet, o *self*, ou o conjunto de componentes do corpo, seria definido ativamente durante a embriogênese. Se durante esse processo outros materiais ou organismos, de fora do corpo (*non-self*), entrassem "acidentalmente" em contato com o embrião, eles seriam percebidos como parte do organismo (*self*). Assim, bactérias, vírus ou células geneticamente diferentes poderiam ser indefinidamente "toleradas" pelo organismo nessa fase. Nessa teoria, embriões e recém-nascidos teriam pouca ou nenhuma reatividade imunológica contra agentes pertencentes ao *non-self*. No caso de um animal adulto, sem contato prévio com o vírus, ser introduzido em uma colônia infectada, esse animal desenvolveria uma meningite viral grave com grande infiltração leucocitária e que o levaria a morte em pouco tempo. Por outro lado, os filhotes que se desenvolveram nessa colônia apresentam uma reatividade inibida ao vírus, sendo resistentes a infecção intracerebral (Traub, 1939). Dessa forma, na teoria de Burnet, a tolerância só estaria prevista quando o contato com o

antígeno fosse feito durante o período perinatal. Sob essa teoria, Chase ressaltou apenas seus resultados experimentais em que a inibição de reatividade era obtida quando o contato com o antígeno por via oral teria sido realizado no período neonatal (Smith e Bridges, 1958). Assim sendo, os resultados de H. Gideon Wells sobre a resistência a anafilaxia a proteínas do milho são coerentes com estes achados, sob a chancela dessa teoria de Burnet. É importante ressaltar o equívoco em relação a afirmação de Chase, pois para que ocorra a inibição na reatividade imunológica através do método de exposição prévia a antígenos por via oral seria necessário um amadurecimento do sistema imunológico do organismo, o que não ocorre em neonatos (Hanson, 1981). Por outro lado, Billingham, Brent e Medawar (Billingham *et al.*, 1953) publicaram em 1953 seus resultados sobre a inibição da reação causada pelo transplante de enxerto de pele ao injetarem células de tecidos de uma linhagem de camundongos em fetos de outra linhagem. Após nascer, esses camundongos “tolerizados” aceitavam o transplante de pele da linhagem doadora, mas não de uma terceira linhagem. Esse resultado sugeria que essa tolerância era devida à ausência de linfócitos reativos ao transplante.

Ao observar esses resultados com experimentos de tolerância a alo-transplantes (alo-antígenos), Burnet entendeu que o mecanismo da auto-tolerância, ou tolerância ao *self*, seria a deleção de linfócitos auto-reativos no período pré- e/ou perinatal. Dessa forma, na teoria de seleção clonal, Burnet caracterizou a tolerância como sendo a ausência de reatividade de linfócitos ao *self*, tendo denominado de “clones proibidos” aqueles que tinha essa capacidade de interagir com moléculas pertencentes ao *self*. Em 1975, Heremans e seu grupo, após descreverem a imunoglobulina IgA em 1959 (Heremans *et al.*, 1959), começaram a estudar as manifestações imunológicas da mucosa a partir do estímulo com administração oral de hemácias de carneiro por 4 dias seguidos (Andre *et al.*, 1975). Ao repetir essa administração oral com hemácias de carneiro após 14 dias, em vez de um aumento nas células formadoras de placas específicas no baço que esperava induzir, observou uma ausência de resposta. Além disso, a reatividade demorou meses para retornar a níveis usuais de uma resposta primária. Em seguida, Donald

Hanson (Hanson *et al.*, 1977) publicou em 1977 resultados intrigantes sobre animais que não apresentavam anticorpos contra ovoalbumina após terem recebido ovoalbumina por via oral, o que fora observado enquanto testava um modelo experimental de aversão imunológica a sabores.

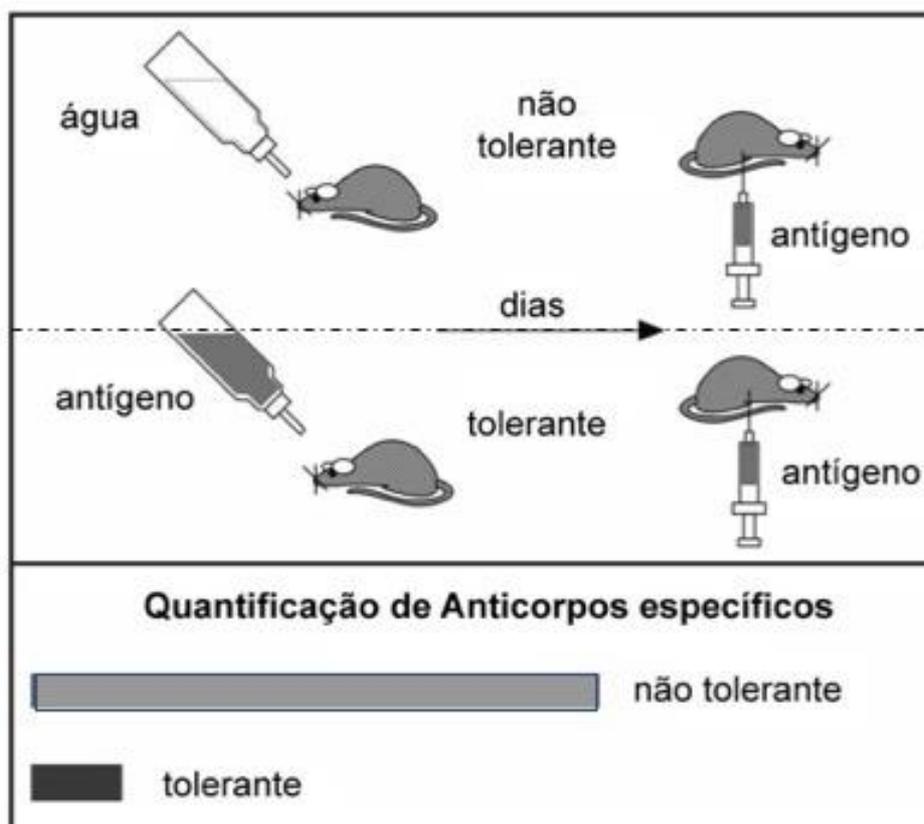


Figura 3. Ilustração representando a indução de tolerância oral (Modificado de Faria *et al.*, 1993). Animais que receberam por via oral determinada proteína desenvolvem uma restrição à produção de anticorpos específicos após imunização por via parenteral com essa mesma proteína.

A indução de tolerância imunológica por exposição do antígeno por via oral foi testada e demonstrada como possível em uma grande diversidade de antígenos, como substâncias químicas sensibilizantes (Chase, 1946b; Glaister, 1973; Asherson *et al.*, 1977), proteínas autólogas normais ou haptenizadas (Neurath *et al.*, 1996; Dasgupta *et al.*, 2001), superantígenos (Migita e Ochi, 1994), células sanguíneas heterólogas (Kagnoff, 1978), esplenócitos

alógenos (Sayegh *et al.*, 1992), extrato de pólen (Aramaki *et al.*, 1994), extrato de ácaros (Suko *et al.*, 1995), proteínas de plantas (Ma *et al.*, 1997; Arakawa *et al.*, 1998), vírus e bactérias inativados (Stokes *et al.*, 1979). Após induzir a tolerância oral ao antígeno determinada, esse efeito pode ser passado do animal tolerizado para um outro animal *naive*, por meio de transferência adotiva de suas células esplênicas (Cunha *et al.*, 2009). Essa capacidade de transferência apresenta de forma mais clara os efeitos da tolerância oral como de atividade supressora, em vez do que anteriormente se postulava como sendo um fenômeno de anergia ou inativação de células imunes envolvidas na reatividade a determinada proteína.

As ações supressoras sobre imunidade inata e celular promovidas pela indução de tolerância oral podem ser visto na redução ou ausência na produção de anticorpos específicos (Hanson *et al.*, 1977; Vaz *et al.*, 1977; Melamed e Friedman, 1994), na amenização de reações de hipersensibilidade (Miller e Hanson, 1979; Titus e Chiller, 1981), na reduzida presença de plasmócitos (Richman *et al.*, 1978; Titus e Chiller, 1981), na diminuição do *clearance* antigênico (Hanson *et al.*, 1979), na inibição da proliferação *in vitro* de linfócitos T (Richman *et al.*, 1978; Titus e Chiller, 1981) e no perfil de secreção de citocinas (Fishman-Lobell *et al.*, 1994; Melamed *et al.*, 1996). Além disso, a tolerância possui maior eficiência sobre a imunidade celular que sobre a imunidade humoral, sendo necessárias doses menores de antígeno para alcançar o mesmo objetivo (Strobel e Ferguson, 1987). Em relação a inibição da produção de citocinas, o perfil de citocinas do tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ) são mais suscetíveis que citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), assim como a produção de anticorpos IgG2a, ligados ao IFN- γ , são também mais suscetíveis que a de anticorpos IgG1, ligados ao IL-4. (Melamed e Friedman, 1994; Claessen *et al.*, 1996) Apesar disso, o tipo de adjuvante utilizado na imunização parenteral na etapa de desafio antigênico pode favorecer a inibição de respostas Th2, caso seja utilizado o hidróxido de alumínio, ou de respostas Th1, caso seja o adjuvante completo de Freund (Tobagus *et al.*, 2004).

Um estudo mais recente (Ramos *et al.*, 2012) teve como objetivo investigar os efeitos da indução de tolerância oral a antígenos cardíacos em

um modelo experimental de ratos Wistar, no qual uma lesão equivalente a um infarto miocárdico era induzida através da injeção de doses elevadas de isoproterenol. Na análise de linfonodos drenantes mediastinais, observou-se a proliferação de linfócitos em resposta ao dano cardíaco em animais “infartados”, com aumento na expressão de TNF- α , IFN- γ e CCL-5, mas não a de FoxP3. No entanto, a análise do grupo tratado previamente por gavagem de extrato de proteínas cardíacas, não mostrou esse aumento na população de linfócitos. O grupo tratado por via oral também mostrou redução na inflamação tecidual e fibrose no coração, inibindo de maneira importante a resposta imune e o déficit funcional no coração resultante da lesão isquêmica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da indução de tolerância oral a antígenos cardíacos sobre linfócitos T na progressão da cardiopatia hipertensiva em ratos SHR e no modelo murino de miocardite aguda chagásica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da indução de tolerância oral a antígenos cardíacos sobre os aspectos morfo-histológicos na progressão da cardiopatia hipertensiva em ratos SHR.

Avaliar os efeitos da indução de tolerância oral a antígenos cardíacos sobre os aspectos morfo-histológicos no modelo murino de miocardite aguda chagásica.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 25 ratos adultos da linhagem de Okamoto, espontaneamente hipertensos, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório, CEMIB/ UNICAMP, e do Instituto de Ciências Biológicas - ICB/ USP, machos e fêmeas, com 12 semanas de idade, e peso corporal de 250g. Na análise inicial para caracterização do modelo de cardiopatia hipertensiva, foram utilizados também 10 ratos Wistar machos normotensos, com idade e peso pareados, proveniente do Biotério da Universidade Federal Fluminense. Em experimentos com Chagas, foram utilizados 20 camundongos adultos da linhagem C57BL/6 provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório - CECAL/ Fiocruz, com 12 semanas de idade e 25g de peso corporal. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (ciclos de 12h/12h claro-escuro) e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) com acesso livre à água e ração. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA UFF N° 457/2014) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEUA N° W006/15).

3.2. PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA ORAL

3.2.1. Preparo do extrato de tecido cardíaco

No início de cada experimento, foi preparada uma solução de proteínas extraídas de 20 corações coletados de animais controles, sendo ratos Wistar ou camundongos Swiss-Webster, respectivamente ao modelo crônico ou

agudo. Esses corações foram fragmentados e extensivamente lavados em PBS 0,15mM e pH7,2. Após essa etapa, os fragmentos de coração eram adicionados a uma solução de PBS 0,15mM e pH 7,2, NP-40 0,35% (Sigma) e coquetel de inibidor de proteases (Roche). Em seguida, essa solução era triturada com homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax (Ika), congelada a -20°C e descongelada em banho-maria a 37°C, sendo repetido 3 vezes. Após esse processo, a solução era centrifugada por 15 minutos a 1000 xG em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante era retirado e congelado em freezer a -20°C. Para quantificar a concentração de proteínas no sobrenadante foi utilizado o método de Bradford. Para quantificação de proteínas por esse método, foi adicionado 1mL do reagente de Bradford a 100µL da solução proteica (diluída 1:100). Em seguida, a leitura foi realizada no espectrofotômetro de placa VERSAmax (Molecular Devices), no comprimento de onda de 595nm.

3.2.2.Administração oral

O protocolo utilizado para administrar por via oral a solução de extrato de proteínas cardíacas foi a indução da ingesta espontânea por 7 dias consecutivos através da solubilização na água das mamadeiras. Anteriormente a cada experimento, foi calculado o volume de ingesta líquida diária por animal. Após o início, cada mamadeira de água foi trocada a cada 24h e o volume residual, caso houvesse, era medido e contabilizado. A partir desse acompanhamento diário conseguimos prover uma ingesta diária de 14-20 mg de proteínas cardíacas.

A estratégia de administração oral escolhida para o modelo de miocardite aguda com camundongos foi a gavagem diária por 7 dias consecutivos. O protocolo de gavagem visou prover uma ingesta de 20 mg de proteínas cardíacas por dia em um volume calculado de aproximadamente 200µL de PBS 0,15mM e pH 7,2. O volume administrado por gavagem variou conforme a concentração da solução de extrato de proteínas cardíacas obtida para cada experimento.

O tratamento oral em todos os experimentos foi baseado em trabalhos prévios com modelos experimentais de tolerância utilizando ovoalbumina que mostram a eficácia desse método de administração oral (Vaz *et al.*, 1977; Carvalho *et al.*, 1994; Verdolin *et al.*, 2001; Da Cunha *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2015).

3.2.3. Imunização

O protocolo de imunização utilizado foi a administração intraperitoneal de 100 µl de uma solução que continha 1 mg de proteínas cardíacas diluídas em 1 mg adjuvante hidróxido de alumínio.

3.2.4. Infecção com *Trypanosoma cruzi*

O protocolo de imunização utilizado no modelo de miocardite chagásica foi a administração intraperitoneal de 200 µL de uma solução que continha 1×10^4 formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y diluídas em PBS. Os parasitas utilizados foram extraídos de camundongos Swiss-Webster infectados conforme descrito previamente (Araújo-Jorge e cols, 1989).

3.2.5. Parasitemia pós- infecção com *T. cruzi*

A contagem de parasitos no sangue dos camundongos foi feita do 6º ao 13º dia pós-infecção (DPI) pelo método Pizzi-Brenner (Araújo-Jorge e Castro, 2000).

3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Como descrito anteriormente, o presente trabalho está dividido em duas linhas de investigação:

A) Modelo experimental de miocardiopatia crônica que utiliza ratos hipertensos (SHR);

B) Modelo experimental de miocardite aguda que utiliza camundongos infectados com *T.cruzi*.

3.3.1. Modelo experimental de miocardiopatia crônica

Em cada experimento desse modelo experimental de acompanhamento de longo prazo, foram utilizados 25 animais hipertensos divididos em 5 grupos (5 animais por grupo):

1) Machos SHR sem tratamento;

2) Machos SHR submetidos a ingesta espontânea oral da solução de proteínas cardíacas por 7 dias consecutivos.

3) Machos SHR submetidos a imunização com extrato de proteínas cardíacas por via intraperitoneal;

4) Machos SHR submetidos a ingesta espontânea oral da solução de proteínas cardíacas por 7 dias consecutivos; e, após 1 semana, imunizados por via intraperitoneal;

5) Fêmeas SHR sem tratamento, utilizadas como controle.

A escolha desse grupo controle foi realizada por compartilharem a mesma base genética de animais SHR. Por ser um estudo com enfoque imunológico e histológico, manter animais heterogênicos como controle poderia estabelecer um viés. Além disso, dados publicados anteriormente (Piro *et al.*, 2010) corroboram a preservação da função e dimensões normais do coração de fêmeas SHR aos 18 meses de idade, enquanto que o desenvolvimento de disfunção do ventrículo esquerdo e insuficiência cardíaca é constatado em machos SHR a partir dos 12 meses de idade.

Após 14 meses de acompanhamento, os animais foram eutanasiados para análise celular e histopatológica. Em todos os experimentos realizados, o

grupo 2 (apenas extrato de proteínas por via oral) não sobreviveu até o final do período de acompanhamento.

3.3.2. Modelo experimental de miocardite aguda

Em cada experimento desse modelo experimental, foram utilizados 20 camundongos C57BL/6 divididos em 4 grupos (5 animais /grupo):

1) Camundongos inoculados por via intraperitoneal com 1×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y;

2) Camundongos submetidos à gavagem com extrato de proteínas cardíacas por 7 dias;

2) Camundongos submetidos à gavagem por 7 dias com extrato de proteínas cardíacas e, após 10 dias, inoculados por via intraperitoneal com *T.cruzi*;

4) Camundongos controles, que receberam por gavagem o tampão sem proteínas e, após 10 dias, injeção intraperitoneal com PBS estéril 0,15m pH7,2.

No 15º dia após a inoculação por via intraperitoneal de *T.cruzi*, os animais foram eutanasiados para análise celular e histopatológica.

3. 4. PARÂMETROS AVALIADOS

3.4.1. Medida da pressão arterial em ratos hipertensos por pletismografia caudal

A medida da pressão arterial sistólica foi aferida indiretamente por pletismografia caudal (Pfeffer *et al.*, 1971), utilizando-se um pletismógrafo caudal (modelo EFF 306 da marca Insight). Este método não permite avaliar

com precisão a pressão arterial diastólica. Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 38°C por 5 minutos com um bio-aquecedor (modelo EFF 307 da marca Insight). Após o aquecimento, foram acoplados o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. Foram medidas as pressões caudais antes do início do tratamento apenas para garantir que os animais estavam hipertensos a partir de 3 meses de idade, pois o objetivo do trabalho não foi a redução da pressão arterial, apenas o impacto sobre a cardiomiopatia. Machos e fêmeas SHR apresentaram aos 3 meses de idade uma pressão caudal sistólica média de 163 ± 11 mmHg. Essa medição não pode ser repetida após o final do acompanhamento de 14 meses devido a fragilidade dos animais envelhecidos que vinham ao óbito durante o procedimento.

3.4.2. Ecocardiografia transtorácica em ratos

Ecocardiografia transtorácica foi realizada no Instituto Biomédico da UFF realizada no aparelho de ecocardiograma ATL-HDI 5000 da Philips e gravados com prova dinâmica focada de 10 MHz. Os parâmetros mensurados foram obtidos em modo-M, sendo calculados a partir da média de 3 ciclos do mesmo parâmetro. Foi realizado o acompanhamento desses animais a cada 3 meses de idade para substanciar e estabelecer um modelo de doença e cardíaca. Apesar disso, a medição aos 18 meses de idade foi prejudicada devido a fragilidade desses animais envelhecidos, tendo todos os animais testados nessa idade ido a óbito durante ou logo após a realização desse exame.

3.4.3. Isolamento de células do miocárdio

Os corações dos animais foram coletados e cortados em fragmentos de 1-2 mm e exaustivamente lavados em PBS 0,15mM pH 7,2, gelado a 4°C para evitar contaminação com células de sangue. Os fragmentos foram então transferidos para uma solução de colagenase tipo II com concentração de

150U/mL (Sigma) e submetidos a 6 ciclos de digestão enzimática em agitação moderada por 10 minutos a 37°C. As células isoladas em cada ciclo foram centrifugadas a 1000xg e imediatamente transferidas para meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's - Sigma) gelado contendo 10% de SFB e mantidas a 4°C. Antes da incubação com anticorpos para a avaliação fenotípica, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com meio DMEM (Sigma) contendo 10% de SFB e 10% de soro de carneiro inativado, para bloqueio de receptores Fc.

A padronização para isolamento de leucócitos foi realizada através de dissociação enzimática do tecido cardíaco. No modelo de hipertensão, corações de machos SHR de 18 meses de idade foram coletados, lavados em PBS e fragmentados para digestão enzimática com colagenase tipo II (150U/ml). As imagens obtidas por microscopia de campo claro confirmam a presença de leucócitos entremeados no tecido cardíaco e as setas indicam alguns leucócitos refringentes. Em seguida, as células isoladas obtidas foram analisadas por citometria. Após diversos testes, conseguimos isolar leucócitos de grandes infiltrados inflamatórios (Fig. 4A). No estágio inicial do processo de dissociação do tecido cardíaco de machos SHR com 18 meses de idade, observamos fibras musculares parcialmente íntegras, focos inflamatórios e leucócitos difusos. Este processo de digestão enzimática é lento e gradual (Fig. 4B) até o isolamento de leucócitos do tecido com um mínimo de debris e fibras musculares (Fig. 4C). Neste último estágio, conseguimos observar grupos de leucócitos altamente refringentes, aparentemente viáveis.

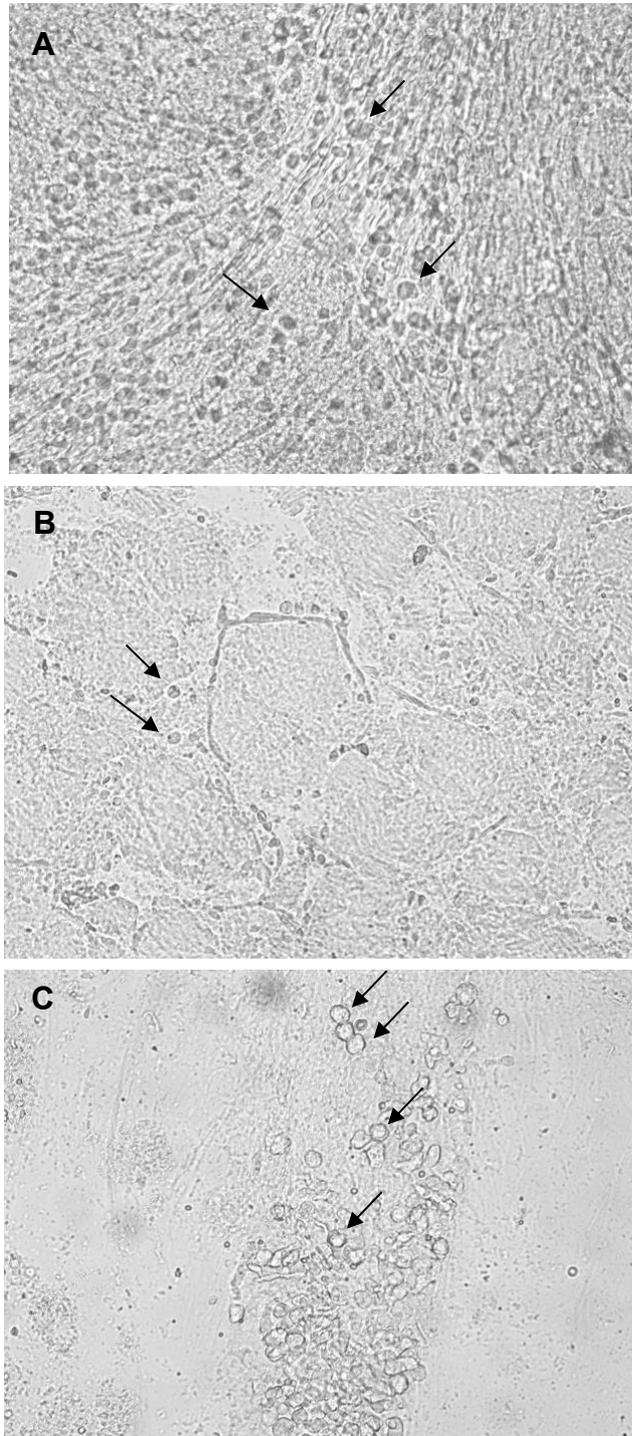


Figura 4. Etapas do processo de isolamento de leucócitos por dissociação do tecido cardíaco. Estágio inicial (A), intermediário (B) e final (C) do processamento tecidual. Setas mostram leucócitos íntegros.

3.4.4. Citometria de células isoladas do miocárdio

A citometria de células isoladas do tecido cardíaco foi realizada em ambos modelos. Os anticorpos utilizados têm como propósito a caracterização fenotípica da população de linfócitos T presentes, como previamente descrito (Guzik *et al.*, 2007).

Para análise fenotípica por citometria de fluxo, células do tecido cardíaco, com receptores Fc bloqueados, foram incubadas nos experimentos do modelo de cardiopatia hipertensiva com os seguintes anticorpos previamente titulados: anti-CD3 APC, anti-CD4 PE-Cy7, anti-CD8 FITC, anti-CD62L PerCP, anti-CD25 PE, anti-CD28 APC, anti-TCR $\gamma\delta$ PE (Biolegend). Os anticorpos utilizados no modelo de miocardite aguda chagásica foram anti-CD4 APC, anti-CD8 PE-Cy7, anti-CD44 PE, anti-CD62L APC-Cy7, anti-CD127 FITC, anti-CD197 PE-Cy5 (BD). O número de eventos adquiridos foi de 10.000 para experimentos do modelo de cardiopatia hipertensiva e de 30.000 para experimentos do modelo de miocardite aguda chagásica.

As marcações foram realizadas em meio DMEM (Sigma) contendo 10% de SFB por 30 minutos a 4°C em 20 μ l finais (células e anticorpos). Após a incubação, as amostras foram lavadas duas vezes em meio DMEM (Sigma), fixadas em formaldeído 2% (Merck) e mantidas em geladeira até a leitura. As amostras no modelo crônico de ratos hipertensos foram adquiridas no citômetro de fluxo CytoFlex (Bekman Coulter); e, no modelo agudo de camundongos com miocardite chagásica, obtidas no citômetro de fluxo Cyan ADP (Dako, Houston, TX, USA).

A análise dos dados foi realizada utilizando o software Flowjo versão 10.1 e o software Summit 4.3 (Dako), sempre na região morfológica (FSC x SSC) excluindo apenas debris celulares e agregados.

No modelo de hipertensão, após padronização do isolamento de células cardíacas, iniciamos as análises de fenótipo por citometria de fluxo, realizadas com marcações de anticorpos anti-CD4 e anti-CD8. Como as amostras são de tecido primário dissociado, é comum observar células em grumos e, por esse motivo, na primeira etapa da análise foi considerada a morfologia celular por meio dos parâmetros FSC em área x FSC pico linear (H) e a delimitação da região de células isoladas para todas as análises subsequentes (Fig. 5, região R1). Em seguida, a subpopulação de linfócitos T (R2) foi definida utilizando os parâmetros de tamanho (FSC) por granulocidade (SSC). Resultados obtidos inicialmente por citometria de fluxo estão indicados na Figura 5 quanto a presença de linfócitos CD4+ e CD8+ em ambas amostras de machos e fêmeas hipertensos. A estimativa percentual das células isoladas mostrou um percentual relativamente maior de linfócitos em machos, comparado a fêmeas da mesma idade. Essa análise teve como principal objetivo mostrar a factibilidade do estudo proposto sobre um tecido cardíaco no contexto de uma doença não imuno-mediada.

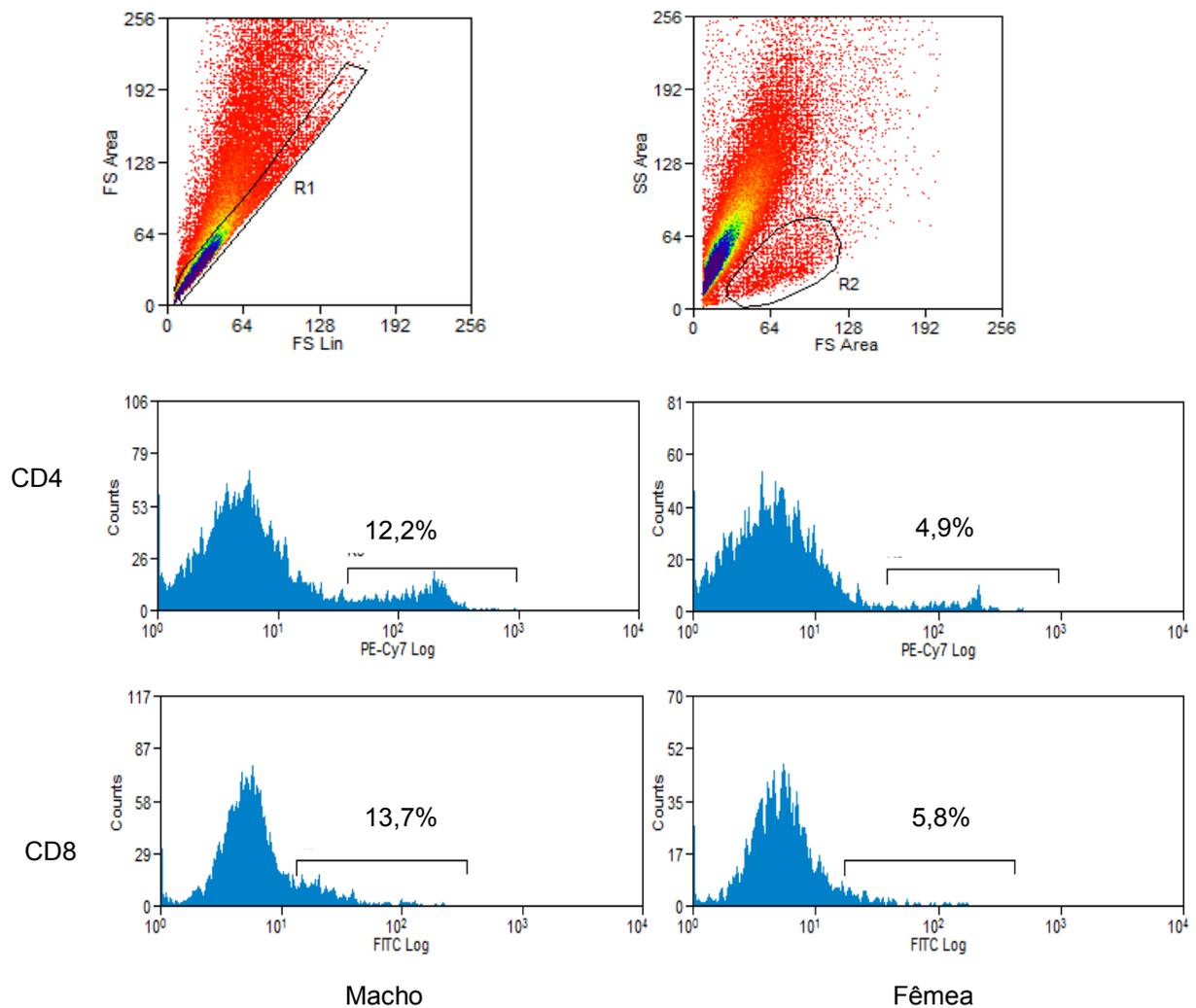


Figura 5. Citometria de fluxo inicial de células isoladas do tecido cardíaco de machos e fêmeas SHR de 18 meses de idade.

3.4.5. Análise histológica quantitativa e qualitativa

Durante cada experimento, animais SHR e C57BL/6, após a eutanásia, tiveram seus corações imediatamente coletados em formaldeído 4%. Após inclusão em bloco de parafina, foram preparadas lâminas histológicas de coração em secção coronal (5 μ m) (Behmer *et al.*, 1975).

3.4.5.1 Análise qualitativa

Para análise qualitativa, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e as características morfo-histológicas analisadas, como infiltrados leucocitário, neovascularização e morfologia da matriz miocárdica.

3.4.5.1. Análise quantitativa

Para análise quantitativa, foi realizado o estudo estereológico. Os cortes das amostras coletadas foram corados com hematoxilina-eosina e exclusão do material apresentando artefatos de fixação e processamento

3.4.5.1.1 Seleção de cortes

De cada coração foram retirados 5 fragmentos, que originaram 5 cortes diferentes de 5- μ m de espessura. De cada corte foram analisados 5 campos aleatórios, perfazendo um total de 25 áreas teste analisadas em cada coração.

3.4.5.1.2 Aquisição das imagens

As imagens para análise e quantificação bidimensional foram obtidas em aumento de 40 vezes, em microscópio óptico Olympus acoplado a uma câmera de vídeo Sony CCD (Monteiro-Leal, 2000), sendo a imagem dos campos microscópicos transferida para um monitor Sony KX14-CP1.

3.4.5.1.3 Estereologia

Os dados foram obtidos pelo método de contagem de pontos superpondo um sistema teste M42 sobre a tela do monitor (Weibel *et al.*, 1966). As características básicas do sistema-teste são A_p (área do ponto-teste), P_t (número de pontos-teste) e d (a menor distância entre pontos-teste). A área-teste pode ser conhecida multiplicando-se o número de pontos-teste pela área de um ponto-teste (Weibel *et al.*, 1966; Gundersen *et al.*, 1988; Mandarin-De-

Lacerda, 2003). O sistema-teste M42 apresenta 42 pontos-teste (Mandarim-De-Lacerda, 2003), a linha-teste mede $21d$ e a área-teste mede: $42 \cdot \frac{\sqrt{3}}{2} \cdot d^2$

As estruturas que tocam as linhas proibidas (tracejadas) não são contadas. As linhas curtas (d) calibram esse sistema-teste e suas extremidades são consideradas os pontos-teste (PP).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média e desvio-padrão de um número (n) de animais. Os dados obtidos pela análise citométrica e histológica foram testados quanto a distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e analisados com o teste estatístico T de Student e as diferenças nas quais o valor de $p < 0,05$ foram consideradas como estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS

4.1. CARDIOMIOPATIA EM RATOS HIPERTENSOS

4.1.1. Avaliação ecocardiográfica

Inicialmente buscamos investigar o modelo experimental de hipertensão com ratos SHR a partir do estudo ecocardiográfico das alterações cardíacas de animais mantidos no biotério da UFF, confrontando com dados publicados na literatura. Os dados obtidos mostram características similares as reconhecidas demonstradas nesse modelo (Tabela 1). A espessura do septo na diástole encontra-se significativamente aumentada em machos SHR nas idades de 3, 6 e 9 meses. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo encontra-se significativamente diminuído em machos SHR nas idades de 3 e 6 meses; e, aos 12 meses, significativamente aumentado em machos SHR. A parede posterior diastólica encontra-se significativamente aumentada em

machos SHR nas idades de 3, 6 e 9 meses. A massa do ventrículo esquerdo ajustada pelo peso corporal encontra-se significativamente aumentada em machos SHR, nas idades de 6, 9 e 12 meses. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo encontra-se significativamente aumentada em machos SHR nas idades de 3 e 6 meses. O índice de espessura relativa das paredes encontra-se significativamente aumentado em machos SHR nas idades de 3 e 6 meses de idade. Todos os animais de 18 meses de idade submetidos a ecocardiografia sofreram óbito durante a indução anestésica ou, logo após, durante o exame.

Idade/ Parâmetro	Grupo	<u>3 MESES</u>				<u>6 MESES</u>				<u>9 MESES</u>				<u>12 MESES</u>			
		N	Media	± DP	P valor	N	Media	± DP	P valor	N	Media	± DP	P valor	N	Media	± DP	P valor
SD diastólico (mm)	SHR	8	0,19	0,02	0,004	8	0,22	0,04	0,002	6	0,23	0,03	0,024	6	0,22	0,02	0,351
	Wistar	7	0,14	0,01		4	0,14	0,02		6	0,20	0,02		3	0,23	0,01	
DVE diastólico (mm)	SHR	8	0,62	0,09	<0,001	8	0,70	0,12	0,046	6	0,66	0,08	0,424	6	0,78	0,05	0,012
	Wistar	7	0,89	0,01		4	0,84	0,01		6	0,63	0,03		3	0,62	0,10	
PP diastólico (mm)	SHR	8	0,19	0,03	0,006	8	0,22	0,04	0,003	6	0,24	0,02	0,066	6	0,23	0,04	0,883
	Wistar	7	0,14	0,01		4	0,14	0,02		6	0,20	0,03		3	0,23	0,01	
MVE ajustado (g)	SHR	8	0,43	0,04	0,216	8	0,44	0,05	<0,001	6	0,45	0,05	<0,001	6	0,46	0,02	<0,001
	Wistar	7	0,46	0,02		4	0,30	0,02		6	0,28	0,02		3	0,32	0,03	
Peso corporal (g)	SHR	8	284,86	22,27	0,214	8	352,56	26,19	0,005	6	366,48	14,89	<0,001	6	373,12	4,27	0,013
	Wistar	7	301,43	18,38		4	403,12	32,28		6	474,77	40,95		3	444,79	57,22	
Ae/Ao	SHR	8	1,02	0,04	<0,001	8	1,19	0,14	0,008	6	0,87	0,43	0,341	6	0,93	0,07	0,153
	Wistar	7	1,25	0,08		4	0,96	0,06		6	1,04	0,05		3	1,00	0,04	
FEVE (%)	SHR	8	92,29	3,43	<0,001	8	91,29	2,86	<0,001	6	91,22	3,32	0,279	6	87,17	3,99	0,223
	Wistar	7	81,29	3,18		4	69,72	2,65		6	89,00	3,39		3	91,43	5,61	
ERP diastólico	SHR	8	0,64	0,18	0,005	8	0,66	0,24	0,021	6	0,72	0,12	0,298	6	0,60	0,10	0,068
	Wistar	7	0,31	0,03		4	0,33	0,05		6	0,65	0,11		3	0,75	0,11	

*SD - espessura do septo; DVE - diâmetro do ventrículo esquerdo; PP - parede posterior; MVE ajustado - massa do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso corporal; Ae/Ao - relação átrio esquerdo/ Aorta; ERP - Índice de espessura relativa das paredes. FEVE- fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos comparando machos SHR e Wistar, pareados por idade.

As análises histopatológicas por H&E confirmam o que fora observado sobre as avaliações por citometria de fluxo, mostrando que fêmeas SHR não desenvolvem infiltração leucocitária tão exuberante quanto machos SHR, seja por células inflamatórias difusas ou compondo focos no tecido cardíaco (figura 6). Não foi observada infiltração inflamatória em machos SHR aos 6 meses de idade. A partir dos 9 e 12 meses de idade, foi observada em machos SHR um infiltrado com focos inflamatórios em progressão, mais evidente com o envelhecimento desses animais (figuras 6b e 6c). Na idade de 18 meses, foi observada uma infiltração leucocitária perivascular em fêmeas SHR, em contraste a grande quantidade de focos inflamatórios difusos pelo tecido cardíaco de machos SHR da mesma idade (figura 6d).

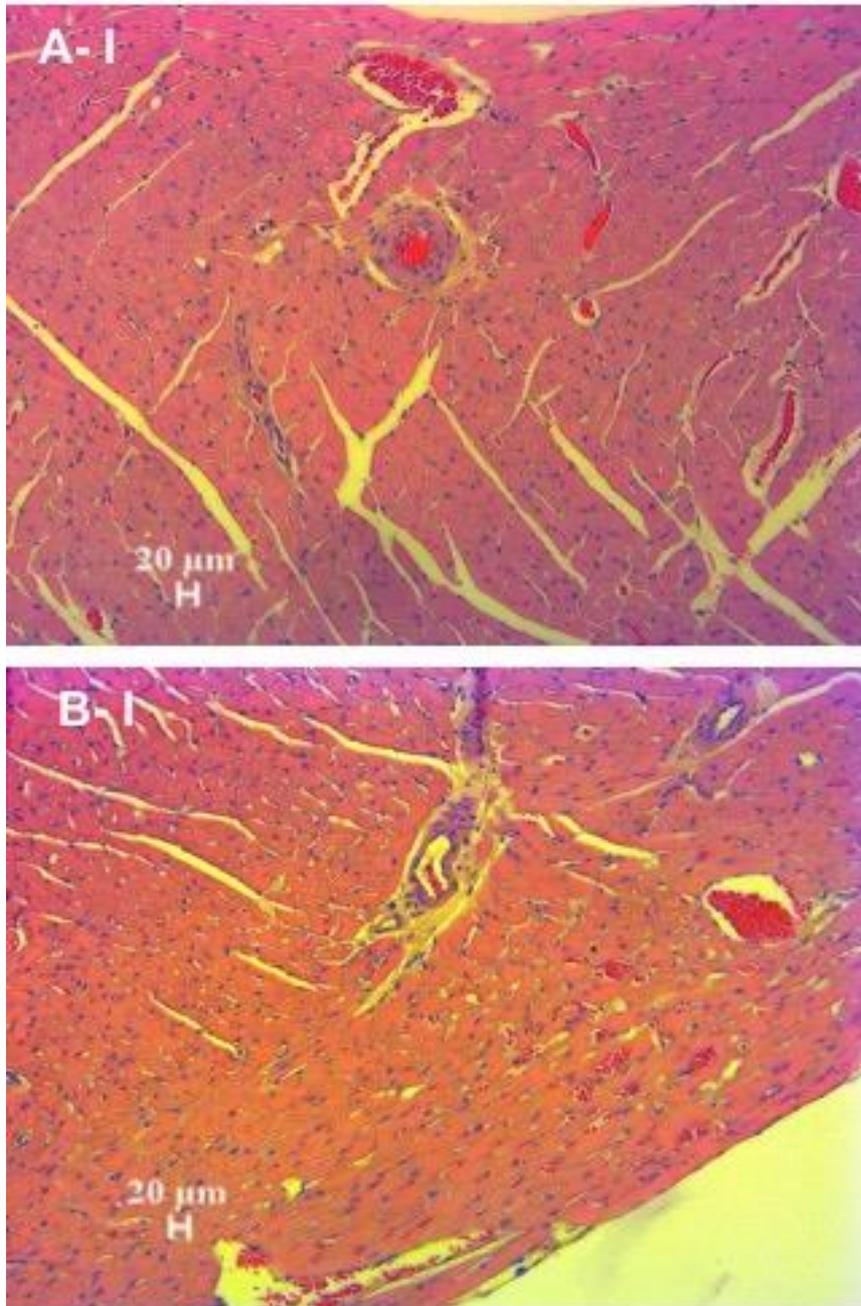


Figura 6a. Cortes de coração corados por H&E de ratos SHR machos (A-I) e fêmeas (B-I) com idade de 6 meses.

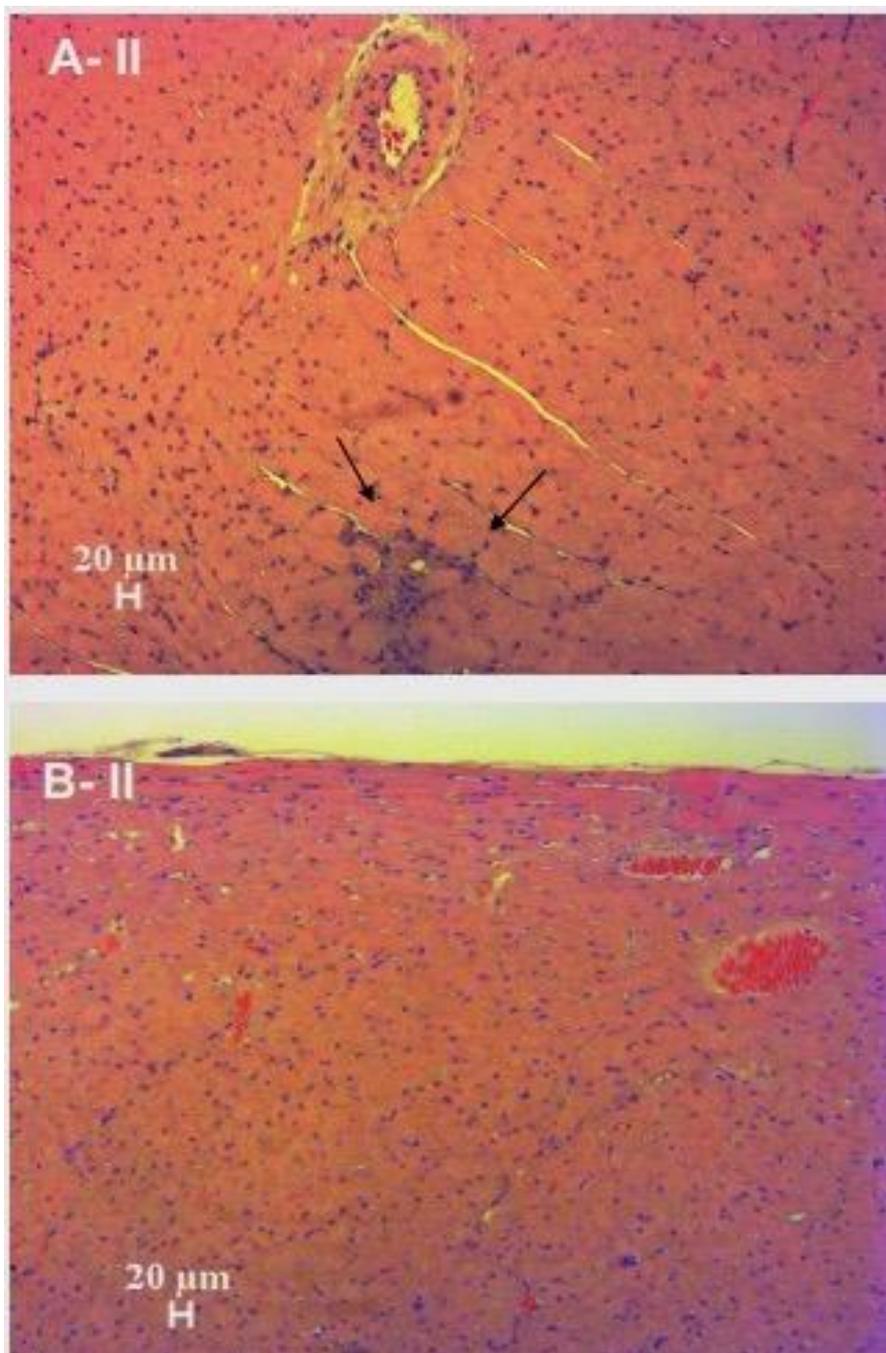


Figura 6b. Cortes de coração corados por H&E de ratos SHR machos (A-II) e fêmeas (B-II) com idade de 9 meses. As setas mostram um infiltrado leucocitário.

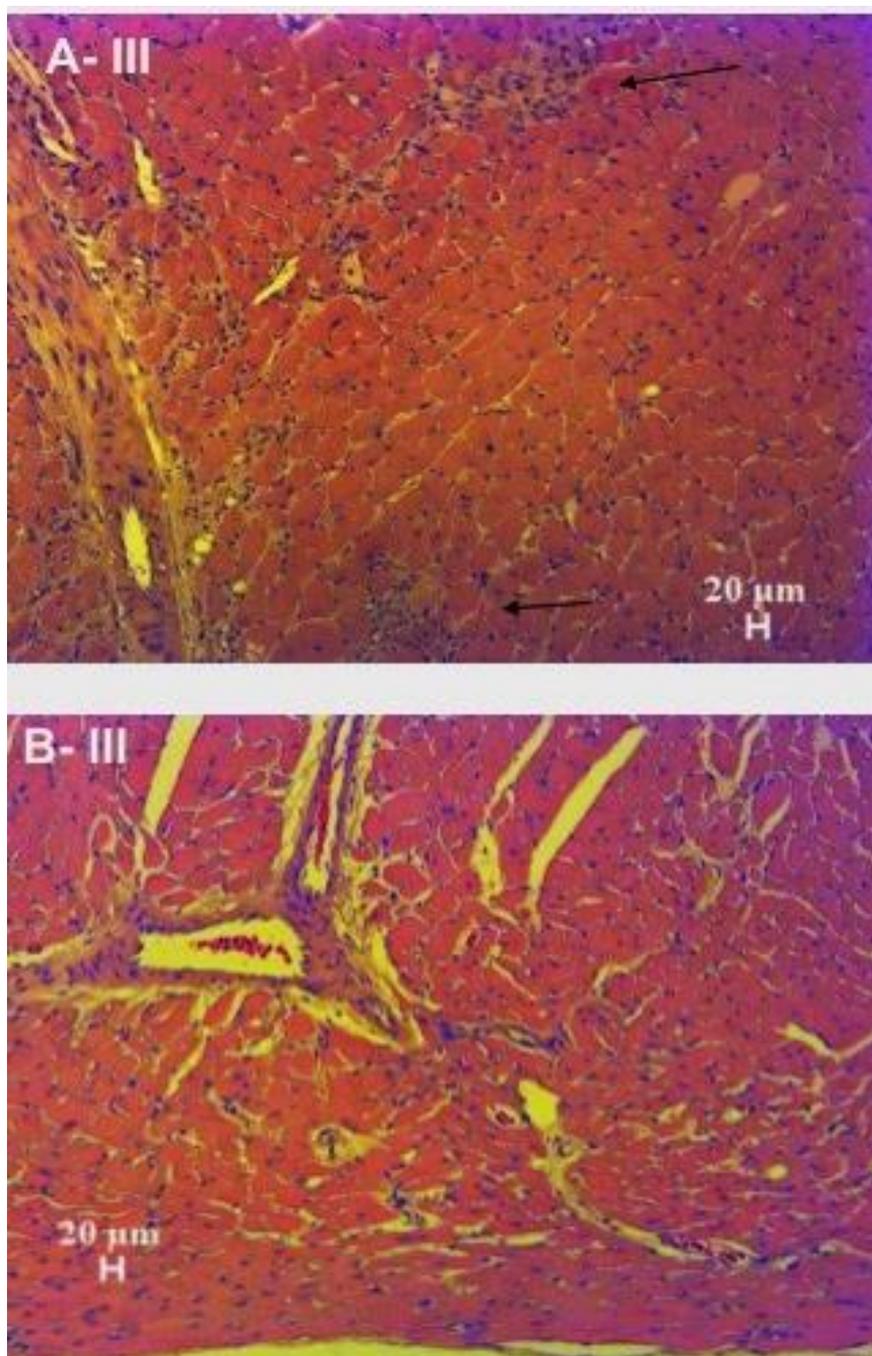


Figura 6c. Cortes de coração corados por H&E de ratos SHR machos (A-III) e fêmeas (B-III) com idade de 12 meses. As setas mostram infiltrados leucocitários.

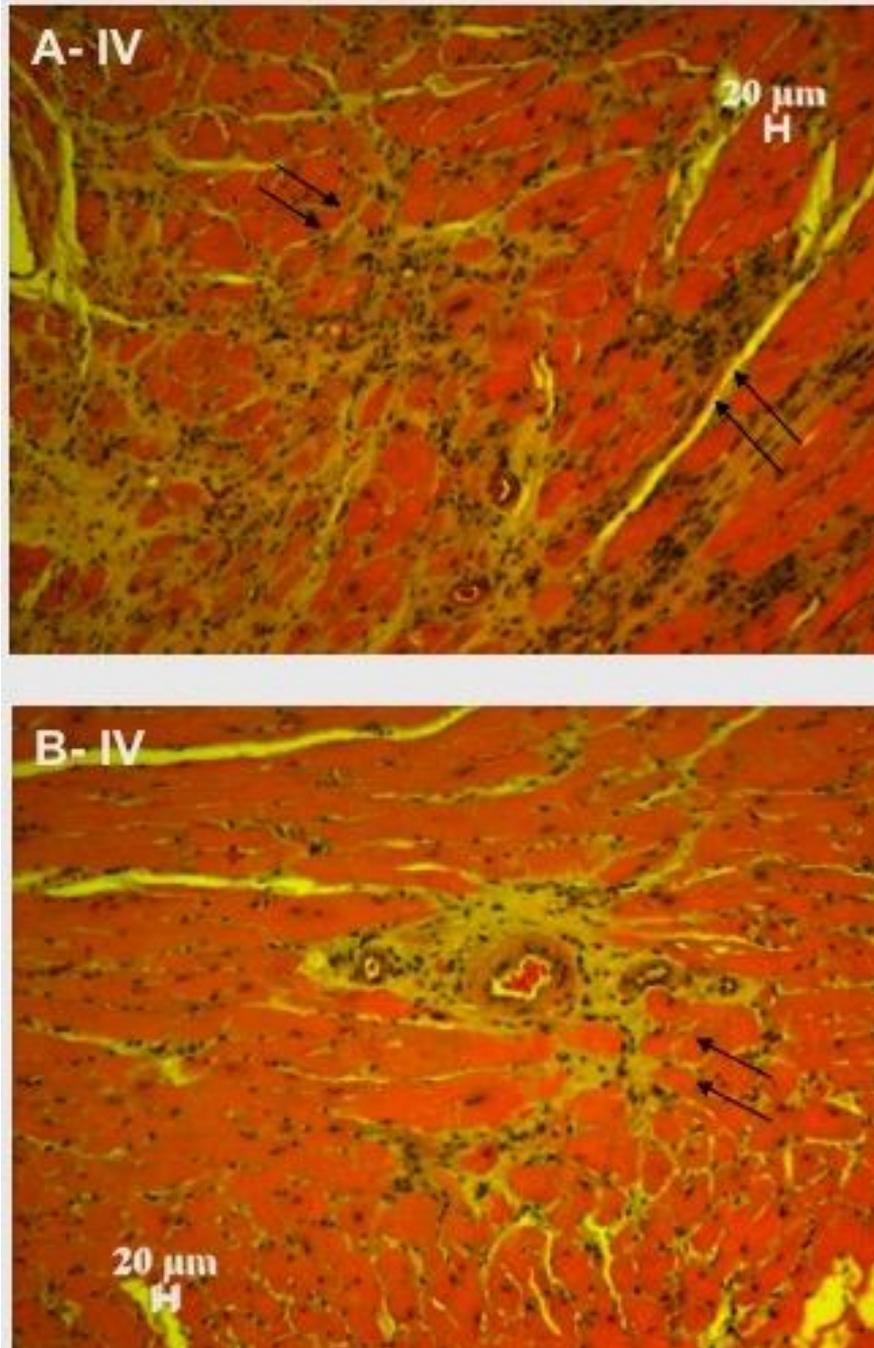


Figura 6d. Cortes de coração corados por H&E de ratos SHR machos (A-IV) e fêmeas (B-IV) com idade de 18 meses. As setas mostram infiltrados leucocitários.

4.2. EXPERIMENTOS EM CARDIOPATIA HIPERTENSIVA

4.2.1. Citometria de células cardíacas de ratos hipertensos tratados com extrato cardíaco

Corações de animais SHR de 18-20 meses de idade foram coletados, lavados em PBS, fragmentados e submetidos a digestão enzimática com colagenase tipo II (150U/ml). Em seguida, analisamos as células isoladas obtidas por citometria de fluxo. O experimento foi repetido quatro vezes, sendo os resultados mostrados nas figuras 7 e 8 obtidos a partir de um experimento, sendo considerado como representativo.

Ao analisar machos SHR não tratados, observamos 5,70% de células CD3+CD4, sendo 45% dessas CD3+CD4+CD44+; Células CD4+CD25+ contabilizaram em 8,07%, células CD4+TCR $\gamma\delta$ em 4,69% e células CD28+ 7,67%. Em contrapartida, ao avaliar machos SHR previamente tratados por via oral e intraperitoneal, houve uma mudança desse perfil. Apesar de mantida próxima as proporções de células CD3+CD4+ (5,78%) e de células CD3+CD4+CD44+ (2,31%), houve um aumento no percentual de células CD4+CD25+(13,30%) e uma diminuição no percentual de células CD4+TCR $\gamma\delta$ (3,19%) e de células CD28+ (5,23%). Estes dados mostram uma alteração fenotípica interessante que pode ter impacto na funcionalidade de estruturas cardíacas. As células isoladas de corações dissociados com colagenase tipo II foram marcadas com os anticorpos indicados e analisados por citometria de fluxo. Todas as análises foram feitas dentro da região R1 de *Singlets* (exclusão de grumos) e na região morfológica de linfócitos.

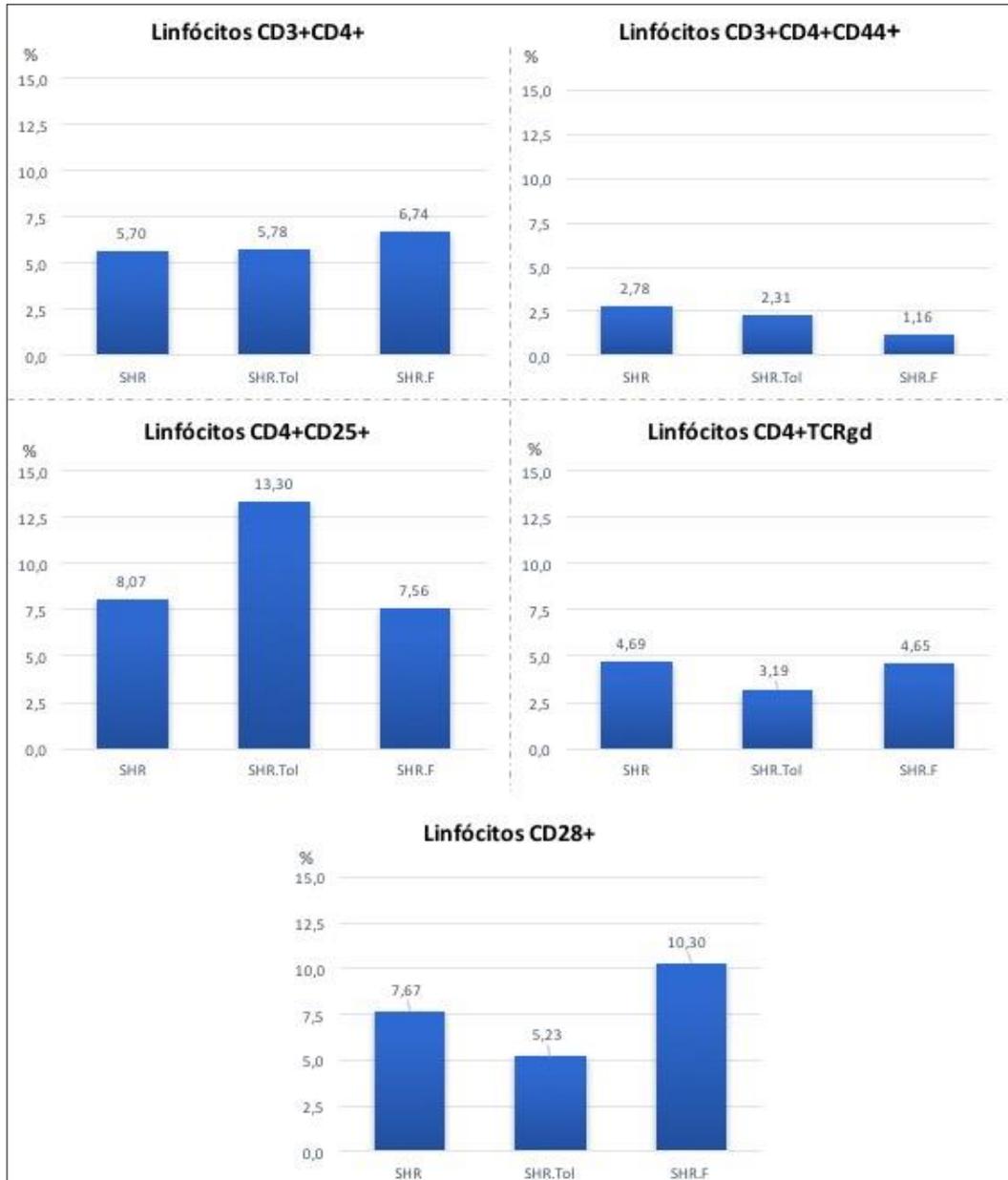


Figura 7. Gráfico de fenotipagem de células isoladas de pool de corações, por citometria, de ratos hipertensos machos (SHR) não tratados (n=3), ratos SHR machos tratados (SHR.Tol) com extrato de proteínas cardíacas por via oral e intraperitoneal (n=3), e SHR fêmeas (SHR.F) não tratadas (n=3).

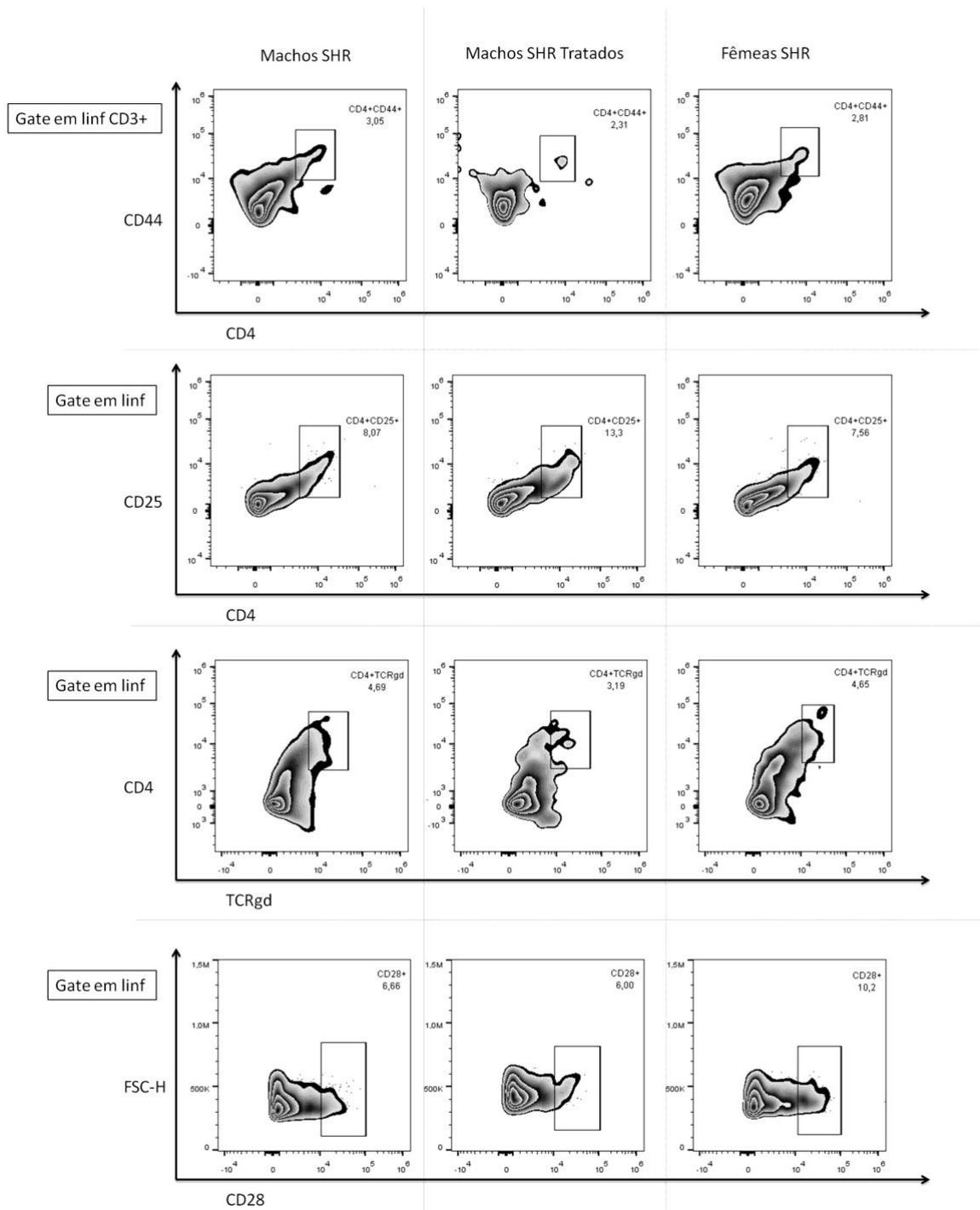


Figura 8. Análise fenotípica da citometria de células isoladas de *pool* de corações de machos SHR não tratados (n=3), machos SHR tratados com extrato de proteínas cardíacas por via oral e intraperitoneal (n=3), e fêmeas SHR não tratadas (n=3).

Para verificar se os achados na análise do fenótipo obtido por citometria de células isoladas de *pool* de corações tem representatividade estatística, reunimos os resultados da citometria de todos os experimentos. A partir disso, foi observado que apenas células CD4+CD25+ apresentaram um aumento significativo ($p=0,04$) no grupo de machos SHR tratados com extrato de proteínas cardíacas por via oral e intraperitoneal, quando comparado a machos e fêmeas SHR não-tratados (fig. 9).

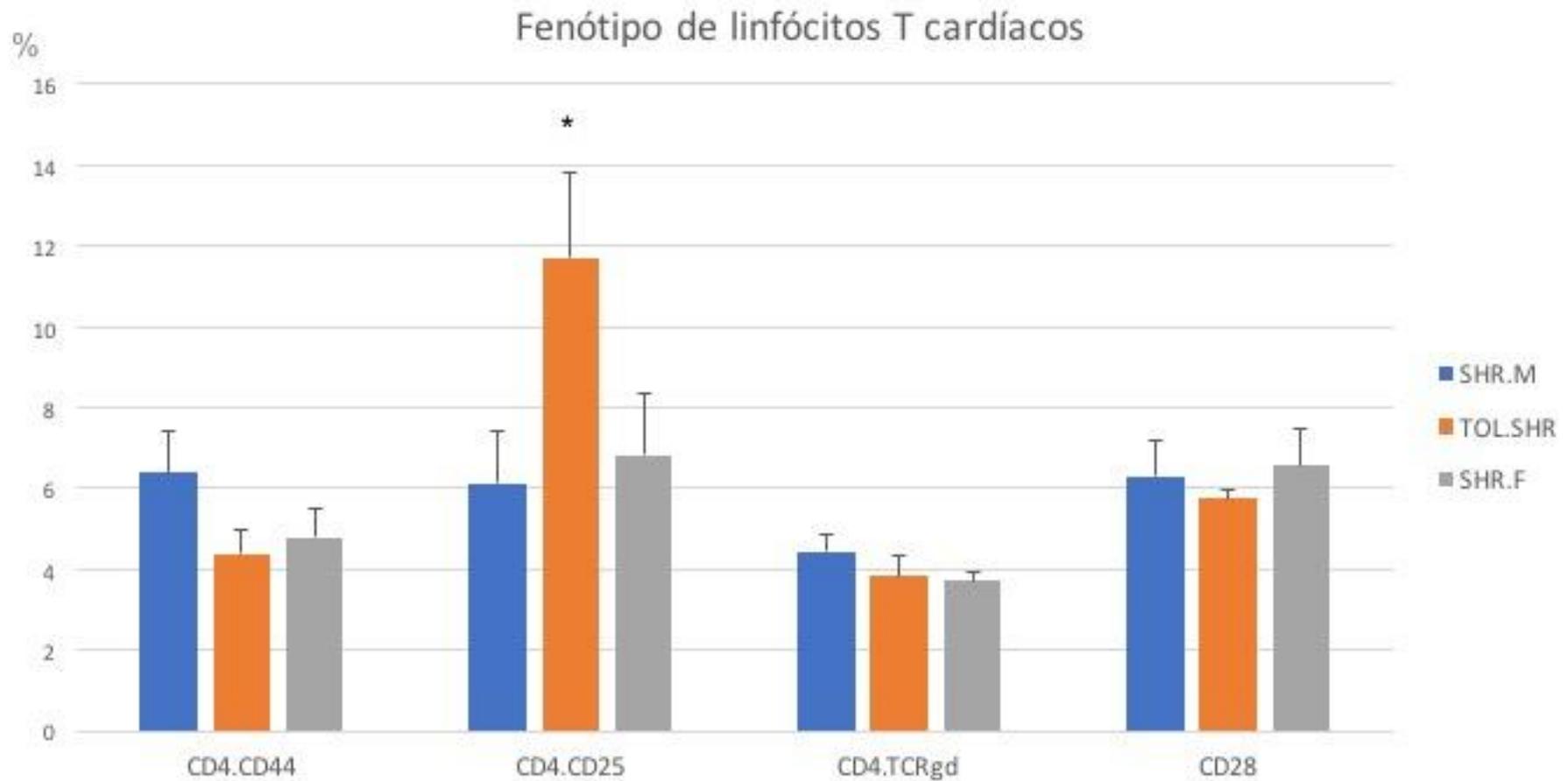


Figura 9. Gráfico da fenotipagem de células isoladas de *pool* de corações, por citometria, de ratos SHR machos (SHR.M) não-tratados (n=9), SHR ratos machos tratados (TOL.SHR) com extrato de proteínas cardíacas por via oral e intraperitoneal (n=9), e SHR fêmeas (SHR.F) não-tratadas (n=9). [* = p<0,05].

4.2.2. Análise histológica de coração de ratos hipertensos tratados com extrato cardíaco

Cortes histológicos de corações corados por H&E são mostrados na figura 10, comparando machos SHR não tratados, machos SHR tratados com extrato de proteínas cardíacas por via oral e intraperitoneal, e fêmeas SHR não tratadas.

Na análise histopatológica do tecido cardíaco, observamos raros focos de infiltração inflamatória perivascular em fêmeas SHR não tratadas (Fig. 10C). Machos SHR não tratados apresentaram extensos focos inflamatórios difusos (Fig. 10A). Em machos SHR tratados por via oral e intraperitoneal, também observamos extensos focos inflamatórios difusos, mas aparentemente mais organizados em torno dos cardiomiócitos, pelo endomísio e perimísio (Fig. 10B).

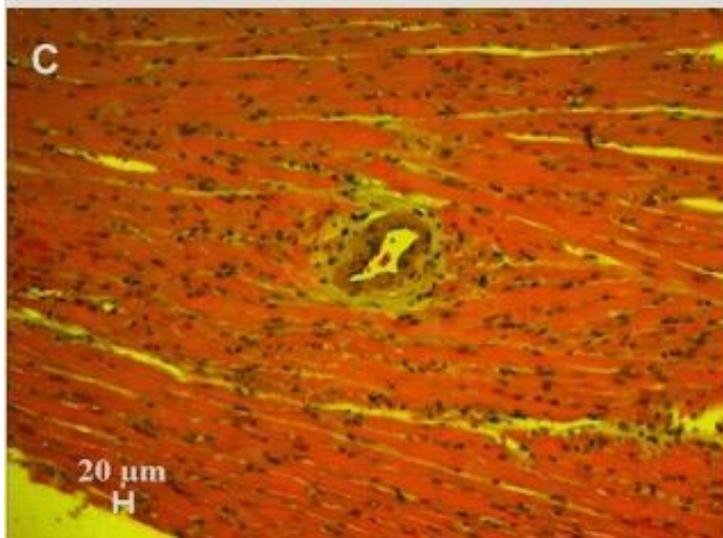
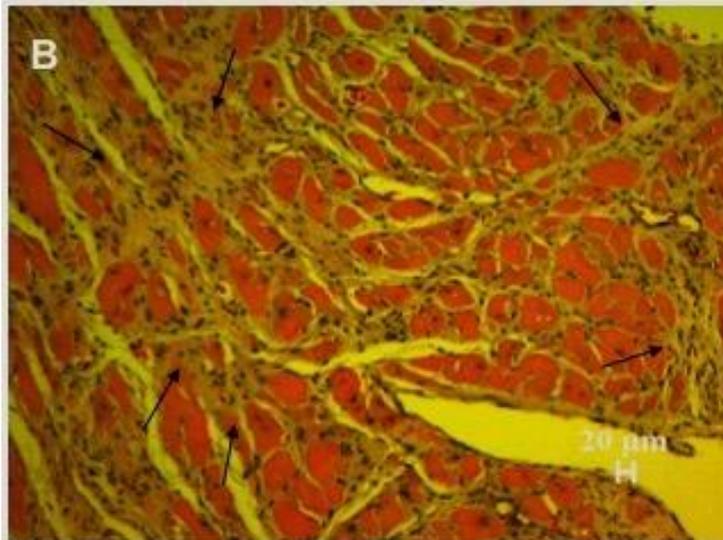
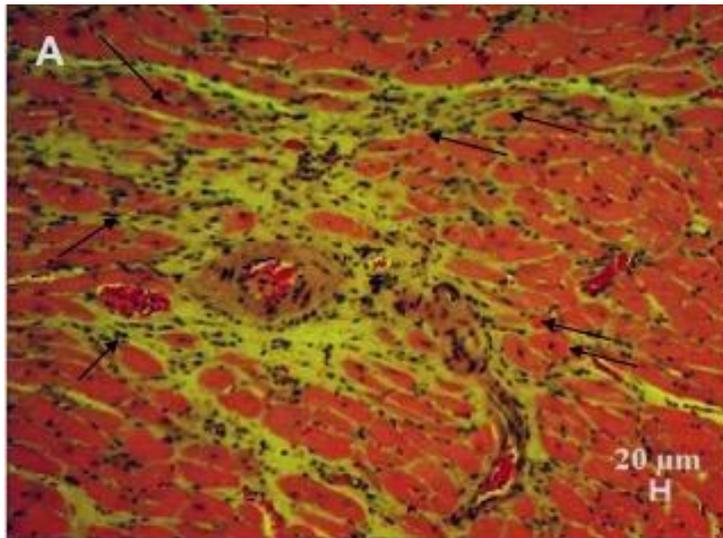


Figura 10. Cortes histológicos de machos SHR (A), machos SHR tratados (B) e fêmeas SHR (C). As setas mostram zonas de infiltrado inflamatório.

Na comparação da análise histológica quantitativa através do teste M42 (fig. 11), observamos uma menor quantidade de musculo cardíaco em ratos SHR machos não tratados. Em fêmeas SHR observamos um menor número de núcleos comparado ao grupo de ratos SHR machos tolerizados; e, maior quantidade de vasos comparado ao grupo de SHR machos não tratados.

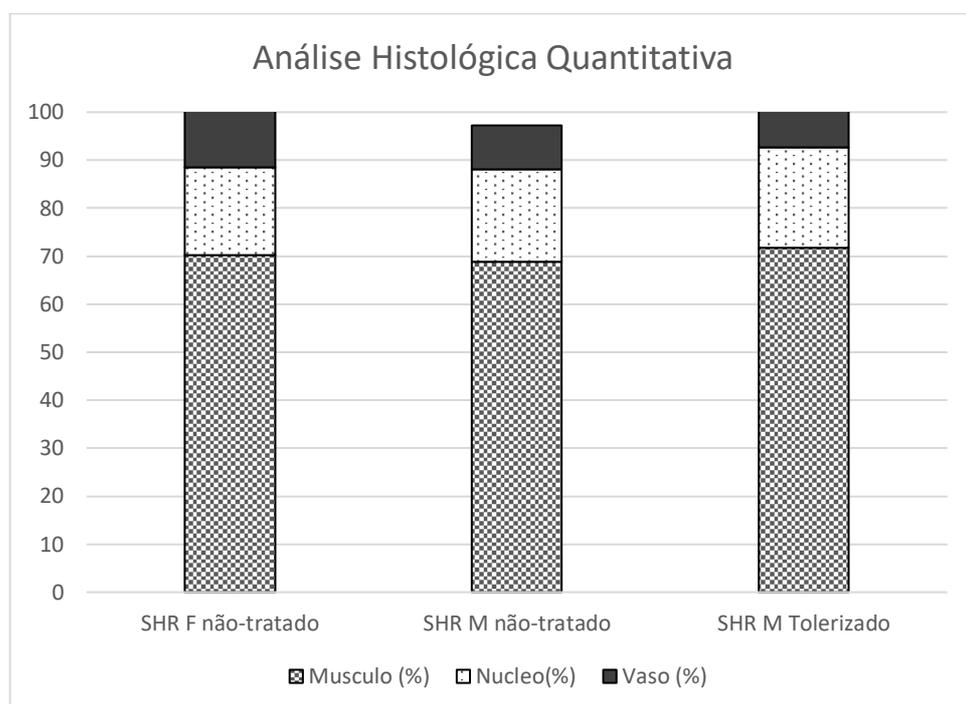


Figura 11. Quantificação da análise histológica de machos SHR, machos SHR tratados e fêmeas SHR.

4.3. EXPERIMENTOS EM MIOCARDITE CHAGÁSICA

4.3.1. Citometria de coração de camundongos C57BL/6 infectados com *T.cruzi*

Para avaliar os efeitos da indução da tolerância oral no modelo murino de miocardite aguda, tratamos de camundongos com extrato de tecido cardíaco por via oral e em seguida a infecção por *Trypanosoma cruzi*. Dessa forma, o protocolo de tratamento utilizado foi similar ao utilizado nos experimentos em animais SHR, preconizando que os efeitos da indução de tolerância a proteínas por via oral poderiam modular alterações inflamatórias cardíacas agudas.

Os corações de camundongos C57BL/6 de 12-14 semanas de idade foram coletados, lavados em PBS, fragmentados e submetidos a digestão enzimática com colagenase tipo II (120U/ml). Em seguida, analisamos as células isoladas obtidas, marcadas com os anticorpos indicados, por citometria de fluxo. Todas as análises foram feitas dentro da região R1 (exclusão de grumos) e na região morfológica de linfócitos (R3). Esse experimento foi repetido quatro vezes, sendo os resultados mostrados nas figuras 12 e 13 obtidos a partir de um experimento, sendo considerado como representativo.

Nos camundongos infectados não tratados, observamos 8,88% de células CD8⁺ e 16,76% de células CD4⁺. Quando avaliamos os animais previamente tratados e infectados, houve uma clara alteração desse perfil, com grande enriquecimento de células CD8⁺ (42,03%) em relação às células CD4⁺ (12,37%). Para a análise do perfil de ativação, foi feita a marcação com anticorpos anti- CD44, avaliando células com alta expressão do marcador (CD44^{high}), CD62L e CD197. Desta forma, as células CD4⁺ e CD8⁺ isoladas do grupo infectado não tratado (Fig. 13) se enquadram no perfil de células ativadas (CD44^{high}CD62L⁻CD197^{-low}), como esperado.

Em camundongos previamente tratados com extrato cardíaco por via oral, houve uma alteração desse perfil. Observamos tanto em células CD4+ como CD8+ uma redução importante no percentual de células expressando CD44^{high}, caindo de 88,3% para 11,7% para células CD4, e de 94,6% para 14,3% (Fig. 14). Desta forma, o fenótipo dos linfócitos T cardíacos foi alterado pelo tratamento, não se enquadrando mais no perfil de células ativadas, que passou a ser CD44^{low}CD62L⁻CD197^{-/low} sobretudo em células CD8. No caso de células CD4+, o fenótipo observado também não se enquadra nos perfis previamente estabelecidos, pois as células aumentaram a expressão de CD197, mas perderam CD44^{high}, se configurando no perfil de células de memória efetoras. Enquanto isso, o grupo controle mostra uma escassez de células CD4+ e CD8+, conforme esperado (fig.15). Estes dados mostram uma alteração fenotípica importante que pode ter efeito sobre alterações funcionais da doença induzida.

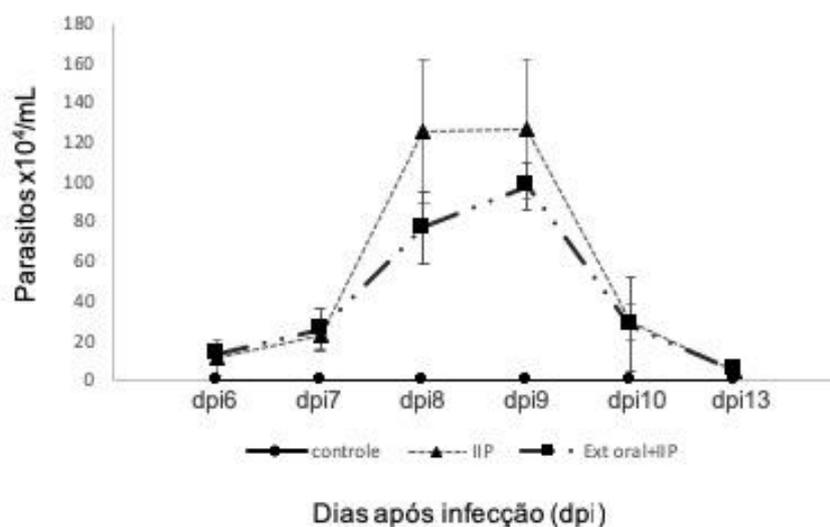


Figura 12. Avaliação da parasitemia após a infecção por *T.cruzi*, considerando grupo de controle, de infectados sem tratamento; e, de infectados e tratados com extrato oral de proteínas cardíacas.

Camundongos B6/7 infectados com *T.cruzi*

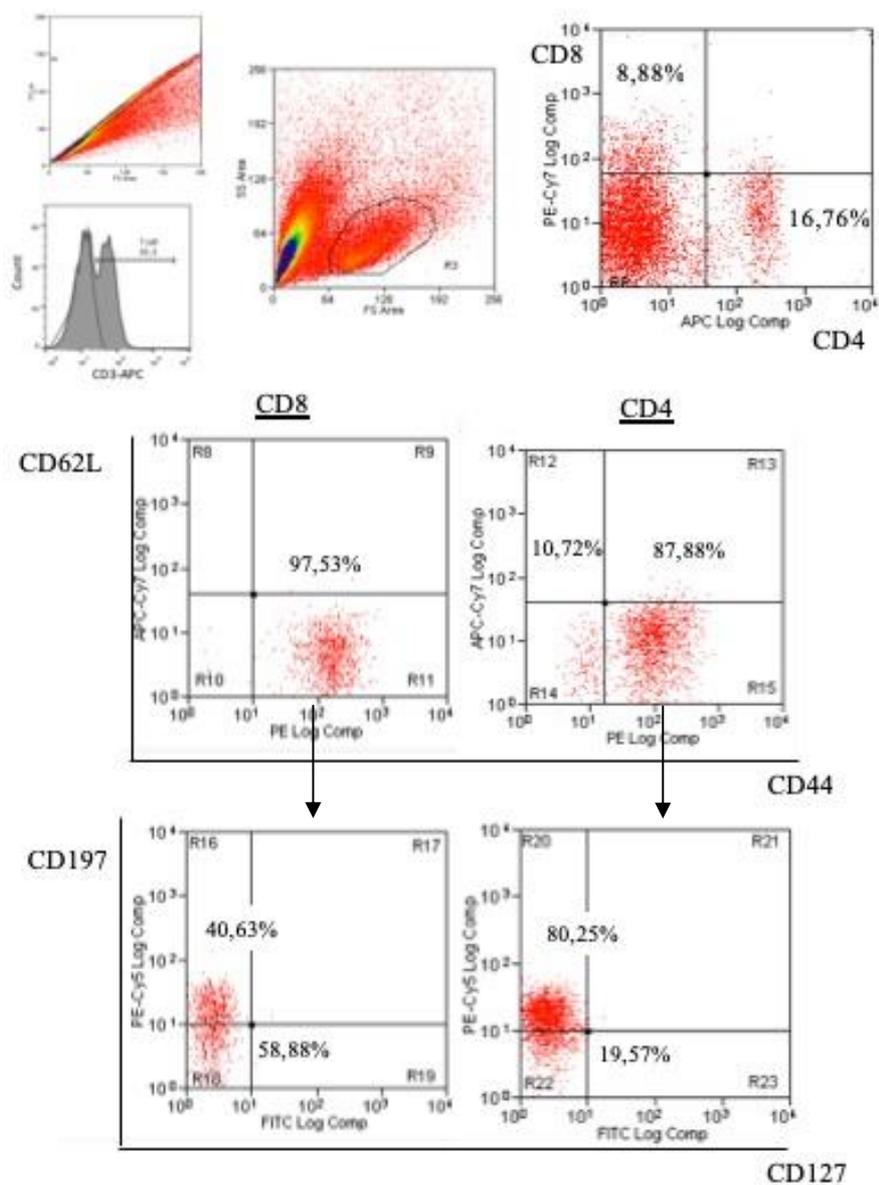


Figura 13. Fenotipagem de linfócitos isolados de *pool* de corações de animais infectados com *T.cruzi* (n=4).

Camundongos B6/7 tratados com extrato cardíaco oral e infectados com *T.cruzi*

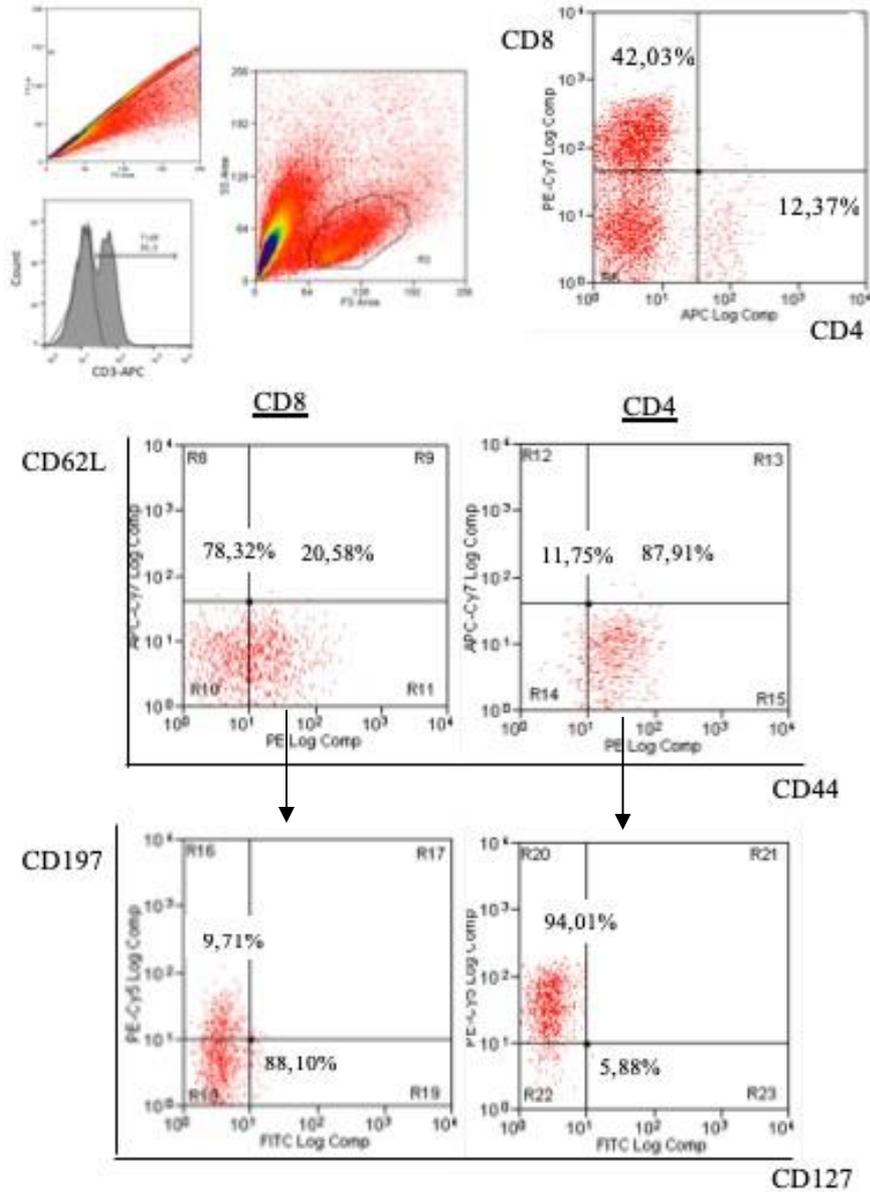


Figura 14. Fenotipagem de linfócitos isolados de *pool* de corações de animais tratados via oral com extrato cardíaco e infectados com *T.cruzi* (n=4).

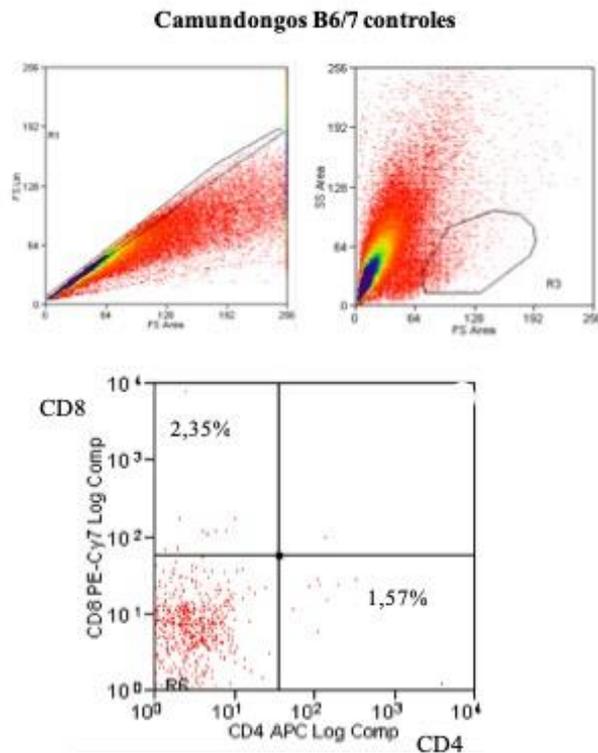


Figura 15. Fenotipagem de linfócitos isolados de *pool* de corações de animais do grupo controle (n=4).

4.3.2. Análise histológica de coração de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*

Cortes histológicos de corações corados por H&E são mostrados na figura 15, comparando camundongos C57BL/6 infectados por via intraperitoneal com 1×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, camundongos tratados com extrato cardíaco e infectados e controles.

Com relação à avaliação histopatológica do tecido cardíaco corado por H&E nos diferentes grupos, não observamos infiltração inflamatória nos animais controle (Fig. 16C). Camundongos infectados e não tratados apresentavam inúmeros focos inflamatórios difusos (Fig. 16A). Em camundongos infectados tratados observamos uma mudança no padrão de infiltração inflamatória, com uma aparente redução no infiltrado (Fig. 16B).

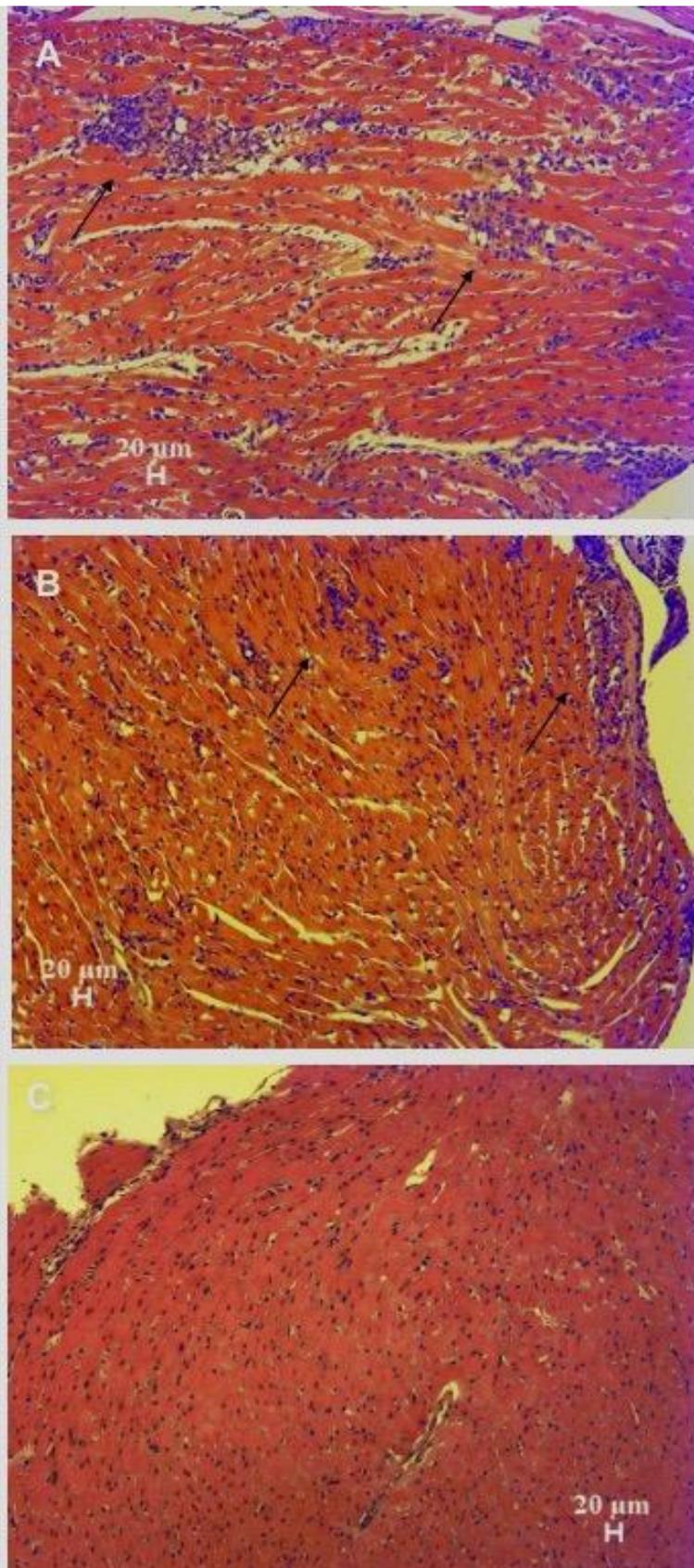


Figura 16. Cortes histológicos de camundongos infectados (A), camundongos infectados e tratados (B) e controles (C). As setas mostram zonas de infiltrado inflamatório.

Na comparação da análise histológica quantitativa através do teste M42 (fig. 17), observamos um menor numero de núcleos e maior quantidade de vasos em camundongos do grupo controle, em comparação com camundongos infectados com *T.cruzi* e com camundongos tolerizados e infectados.

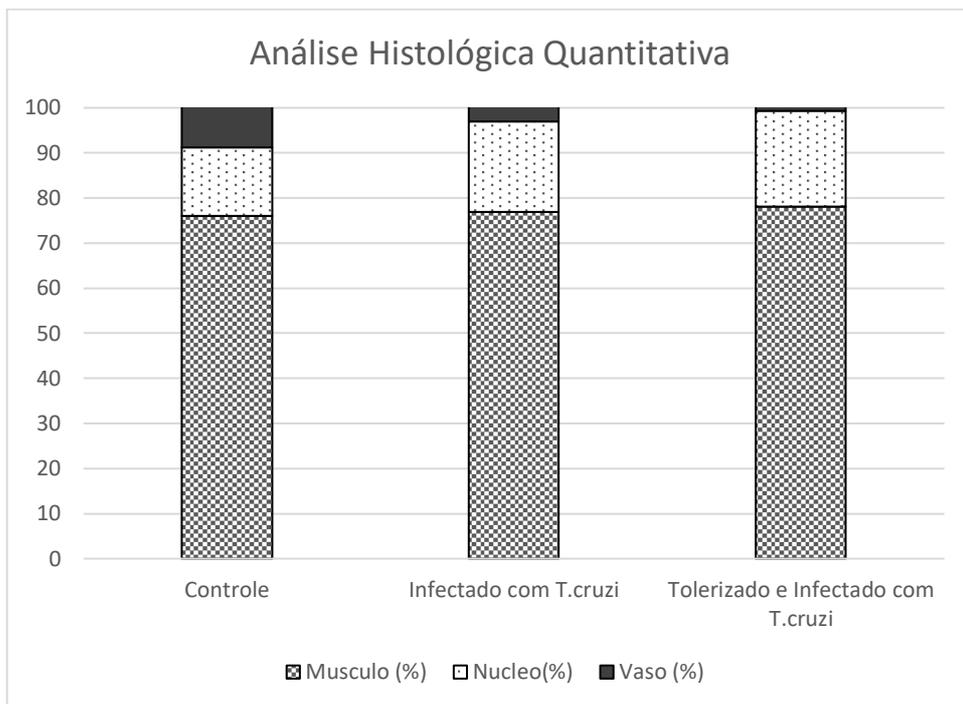


Figura 17. Quantificação da análise histológica de camundongos infectados com *T.cruzi*, camundongos tolerizados e infectados, e controles.

5. DISCUSSÃO

5.1. CARDIOPATIA CRÔNICA HIPERTENSIVA

O principal achado no presente estudo foi a mudança de fenótipo em animais machos SHR tratados com extrato de proteínas cardíacas por via oral e intraperitoneal, tendo sido observado um aumento no percentual de linfócitos CD4+CD25+(13,30%) e uma diminuição no percentual de linfócitos CD4+TCR $\gamma\delta$ (3,19%) e CD28+ (5,23%), enquanto mantida proporções similares de linfócitos CD3+CD4+ (5,78%) e CD3+CD4+CD44+ (2,31%) (fig.7). A única subpopulação que mostrou diferença estatisticamente significativa foi a de linfócitos CD4+CD25+ (fig.9).

O sistema imune parece ter participação importante no remodelamento cardíaco. Em um modelo experimental em camundongos submetidos exposição prolongada de uma bomba infusora de angiotensina-II foi observada a indução de remodelamento cardíaco hipertrófico, acompanhada de um aumento na subpopulação de linfócitos T CD4+ ativados circulantes. Ao se administrar, por transferência adotiva, células T reguladoras constataram que houve uma redução na hipertrofia e fibrose cardíaca (Kvakan *et al.*, 2009). Linfócitos T reguladores apresentam efeitos indutores de produção de citocinas Th2 anti-inflamatórias e de supressão de respostas imunes locais e sistêmicas (Alferink *et al.*, 2003). Em outro estudo com modelo de ratos submetidos a sobrecarga de pressão no ventrículo esquerdo, linfócitos T reguladores também se mostraram capazes de promover a redução na fibrose miocárdica, apesar da pouca efetividade sobre a redução da hipertrofia ventricular esquerda (Kanellakis *et al.*, 2011).

Um estudo mais recente mostrou o papel crucial de linfócitos T, especialmente a subpopulação de T CD4+, no desenvolvimento do remodelamento cardíaca induzido por sobrecarga de pressão e sua progressão a insuficiência cardíaca. Os linfócitos T CD4+ têm a capacidade de agravar o processo de remodelamento e desencadear uma piora, levando a progressão da hipertrofia cardíaca para insuficiência (Laroumanie *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, não observamos mudanças significativas na subpopulação de linfócitos T CD3+CD4+ e na subpopulação de linfócitos T ativados (CD3+CD4+CD44+), ao comparar machos SHR tratados e não-tratados (fig.7).

Um estudo interessante com ratos controles de 12 a 15 meses de idade evidenciou um aumento na proporção de linfócitos T CD4+ ativados (CD44^{high} CD62^{low}) em linfonodos mediastinais e poplíteos, quando comparados com animais jovens controles. No entanto, esse aumento de células T efetoras foi mais pronunciado em linfonodos mediastinais. Adicionalmente, enquanto a maior parte dos linfócitos T CD4+ presentes em linfonodos mediastinais de animais jovens apresentava o fenótipo CD4+ Foxp3+, a subpopulação predominante em animais idosos era de linfócitos T CD4+ Foxp3- (Ramos *et al.*, 2017). O processo de envelhecimento de ratos é acompanhado por um aumento na celularidade de linfonodos mediastinais, que são drenantes para o coração, mas não em linfonodos poplíteos, o que sugere uma interessante atividade imuno-inflamatória que pode estar ocorrendo localmente em corações de animais mais velhos. Em nosso estudo, observamos um aumento significativo na subpopulação de linfócitos T CD4+CD25+ em machos SHR tratados, quando comparado com machos SHR não-tratados e fêmeas SHR (fig.9).

Linfócitos T CD4+CD25+ têm sido demonstrados como capazes de suprimir clones de linfócitos T autorreativos e, por conseguinte, apresentam-se como fundamental em modulações da tolerância imunológica periférica (Sakaguchi *et al.*, 2001; Shevach, 2002). Em contrapartida, ratos *knockout* para CD25+ desenvolvem processos linfoproliferativos e doenças auto-imunes espontâneas. Em humanos, a deficiência de CD25 está associada ao aparecimento de células T autorreativas (Sharfe *et al.*, 1997).

Alguns estudos têm sugerido que linfócitos T que expressam TCR $\gamma\delta$ seriam mediadores mais potentes de apoptose de cardiomiócitos quando comparado a linfócitos T TCR $\alpha\beta$. Dessa forma, apontam os linfócitos T TCR $\gamma\delta$ como sendo um dos principais responsáveis pela lesão no miocárdio associada à miocardiopatia dilatada, como, por exemplo, ocorre durante a miocardite

infecçiosa induzida pelo vírus coxsackie-B3 (Huber, 2000). As diferenças nos padrões de atividade citotóxica observadas em linfócitos $TCR_{\alpha\beta}$ e $TCR_{\gamma\delta}$ podem estar atribuídas aos tipos de antígenos presentes nas mais diversas situações. Enquanto linfócitos $TCR_{\alpha\beta}$ têm maior afinidade com epítopos antigênicos associados a moléculas de MHC, linfócitos $TCR_{\gamma\delta}$ geralmente reagem a antígenos que estão distribuídos de maneira mais difusa. Dessa forma, dentre os principais antígenos reconhecidos por linfócitos $TCR_{\gamma\delta}$ estão as proteínas de choque térmico (Born *et al.*, 1990), que são liberadas no âmbito local e sistêmico através de múltiplas formas de estresse, incluindo infecções e lesões teciduais com liberação de radicais livres e citocinas pro-inflamatórias (Huber, 1992; Heng e Heng, 1994; Sciammas *et al.*, 1994). Apesar de o modelo crônico em nosso estudo não se tratar de miocardite infecciosa, o tratamento de machos SHR promoveu uma redução na subpopulação de linfócitos T $CD4+TCR_{\gamma\delta}$, quando comparado com machos SHR não-tratados e fêmeas SHR (figura 7 e 8). No presente estudo, infelizmente não pudemos medir a taxa de apoptose que poderia estar relacionada a diminuição da presença e atividade de linfócitos T $TCR_{\gamma\delta}$ no tecido cardíaco.

Diversos autores sugerem que a tolerância oral possa ser mantida por um estado de inativação de linfócitos T, definido por uma capacidade limitada de proliferação e de secreção de IL-2, assim como a não-apresentação de receptores para IL-2 ao serem colocados em cultura com o antígeno tolerizado, previamente por via oral. Por outro lado, ao se administrar IL-2 recombinante foi observada a reversão deste perfil de anergia dos linfócitos *in vitro*, tendo recuperado a capacidade de se proliferar e produzir IL-2 (Melamed e Friedman, 1993; 1994). Essa indução de um estado de anergia linfocitária estaria intrinsecamente associada a ausência de moléculas co-estimuladoras, como o CD28 durante a interação entre o TCR e moléculas do MHC. Machos SHR submetidos ao protocolo de indução de tolerância oral, em nosso estudo, apresentaram uma redução na proporção da expressão de CD28+ em linfócitos, quando comparado a machos SHR não-tratados e fêmeas SHR (fig. 7 e 8), o que poderia ser um indicativo da presença do estado de anergia linfocitária que caracteriza a tolerância oral.

A inflamação e a ativação do sistema imune também apresentam participação importante na hipertensão sistêmica, principalmente na indução de dano a órgãos-alvo. O dano a órgãos-alvo, especialmente hipertrofia e insuficiência cardíaca, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na doença hipertensiva. A progressão do quadro de cardiopatia hipertensiva para insuficiência cardíaca está associada ao remodelamento miocárdico, que pode ser explicado, em parte, pelo rearranjo da matriz extracelular cardíaca. Com base em dados morfológicos, ecocardiográficos e hemodinâmicos, estudos têm definido a cardiopatia hipertensiva em quatro fases distintas: hipertensão sistêmica, disfunção diastólica, disfunção sistólica e insuficiência cardíaca descompensada. No modelo animal experimental de ratos hipertensos (SHR), essas fases corresponderiam, respectivamente, às idades de 3, 12, 18 e 24 meses (Legrice *et al.*, 2012). Dentre as variáveis ecocardiográficas, um estudo recente (Legrice *et al.*, 2012) observou que o diâmetro ventricular esquerdo diastólico final foi o mesmo em ratos SHR e controles WKY aos 3 meses de idade, mas apresentou um aumento maior com o envelhecimento em animais SHR do que controles (Legrice *et al.*, 2012). Em nosso estudo, observamos, de forma similar, uma tendência de aumento no diâmetro ventricular esquerdo diastólico final de machos SHR em comparação com controles. O mesmo estudo (Legrice *et al.*, 2012) mostrou que outro parâmetro alterado seria a fração de encurtamento, que foi similar em ambos grupos com idade de 3 e 12 meses mas substancialmente reduzido em machos SHR de 18 e 24 meses (Legrice *et al.*, 2012). Em nosso estudo, observamos uma queda na fração de encurtamento no exame ecocardiográfico de um animal SHR na idade de 18 meses comparado as idades de 3-12 meses, mas esse dado não é considerado representativo já que foi obtido de apenas 1 animal, o qual foi ao óbito assim que o exame foi terminado.

Um achado interessante em nosso estudo foi a massa do ventrículo esquerdo mensurada pelo ecocardiograma. Essa variável apresentou um aumento importante em ratos SHR, quando pareado com controles. A sobrecarga de pressão (hipertensão) é provavelmente a responsável pela hipertrofia progressiva do ventrículo esquerdo, podendo evoluir com a idade

para disfunção cardíaca através do remodelamento cardíaco. Além do aspecto funcional, outro ponto a ser evidenciado no modelo de cardiopatia crônica hipertensiva é a participação de células do sistema imune. A partir do processo de dissociação do tecido cardíaco com a enzima colagenase II em ratos SHR machos com 18 meses de idade, conseguimos evidenciar 3 etapas (fig.4). Além da digestão do tecido propriamente dito, é interessante notar a presença de leucócitos aderidos às fibras musculares (figura 4A), ao redor da fibra próximo ao endomísio (figura 4B); e, destacados do musculo cardíaco, na forma de células isoladas (figura 4C). Após esse processamento do tecido cardíaco, as células isoladas foram caracterizadas por citometria. Machos SHR apresentaram um percentual maior de linfócitos T CD4+ e CD8+ quando comparados às fêmeas SHR (fig. 5). Alguns estudos têm demonstrado que machos SHR desenvolvem doença cardíaca mais pronunciada enquanto fêmeas apresentam distúrbio renal (Iams e Wexler, 1979; Tipton *et al.*, 2012). De forma complementar, ao comparar cortes histológicos do tecido cardíaco, observamos que machos SHR de 9 meses de idade (fig. 6b) apresentaram zonas de infiltrado inflamatório ao redor de fibras musculares e, em maior quantidade, na idade de 12 meses (fig. 6c). Na análise histológica do coração de fêmeas SHR não foi constatada a presença de infiltrado inflamatório até os 12 meses de idade. Nas fêmeas SHR com 18 meses de idade, foi observado esparsos infiltrados inflamatórios.

Diversos estudos têm sugerido a existência de um componente imune na regulação da pressão arterial de ratos SHR machos. Por exemplo, um estudo mostrou que ao injetar soro anti-timócitos em machos SHR, a pressão arterial diminuiu significativamente. Ao se realizar o transplante de timo de controles normotensos (WKY) para animais SHR, ocorre também uma atenuação da hipertensão (Bendich *et al.*, 1981; Ba *et al.*, 1982). Um estudo mais recente (Rodriguez-Iturbe *et al.*, 2002) mostrou que o imunossupressor micofenolato mofetil foi capaz de normalizar a pressão arterial em machos SHR. Esse imunossupressor é um inibidor reversível da inosina monofosfato desidrogenase, uma enzima crítica na síntese *de novo* de nucleotídeos de guanosina, requerida para a produção e proliferação de linfócitos T e B. Esse

efeito reforça a provável relação direta da imunidade celular com a hipertensão em machos SHR. Em humanos, células T CD4+ são o principal fenótipo vinculado a hipertensão. Um estudo interessante ressaltou a baixa incidência de hipertensão em pacientes HIV+ do sexo masculino com déficit de linfócitos T CD4+. Ao aumentar a contagem de células T CD4+ com o uso de medicamentos antirretrovirais, se observa um aumento nos casos de hipertensão (Seaberg *et al.*, 2005).

A sobrecarga no ventrículo esquerdo e o processo de envelhecimento estão associados ao aumento de fibrose intersticial no coração. Um estudo interessante (Hinglais *et al.*, 1994) mostrou a estreita relação entre fibrose, atividade de fibroblastos e infiltração de células inflamatórias. Ao comparar ratos Wistar com SHR aos 2 meses de idade, não houve diferenças. No entanto, aos 22 meses de idade as áreas de fibrose e infiltração celular intersticial eram mais extensas do que aos 12 meses de idade, sendo claramente mais proeminente em animais SHR que em controles Wistar. Além disso, esse estudo também sugeriu a relação próxima da quantidade e atividade entre fibroblastos, macrófagos e linfócitos CD4+ (Hinglais *et al.*, 1994). Em nosso estudo, na tentativa de promover uma modulação na resposta a antígenos cardíacos, a intensa atividade de fibroblastos e linfócitos pôde ser estimada na análise histológica, sendo evidente em machos SHR não-tratados e machos SHR tratados (fig.10). Foi observado uma diferença no padrão de apresentação da fibrose e infiltrado leucocitário, sendo mais organizado e menos difuso no grupo de machos SHR tratado que no não-tratado. Apesar disso, foi constatado na estereologia (fig.11) uma diferença significativa na quantidade de núcleos comparando machos SHR e fêmeas SHR, enquanto que machos SHR tratados apresentaram uma quantidade intermediária de núcleos. Fêmeas SHR apresentaram uma quantidade de vasos significativamente maior em relação a machos SHR tratados.

5.2. CARDIOPATIA AGUDA CHAGÁSICA

A doença de chagas, causada pela infecção do parasito protozoário *Trypanosoma cruzi* é enfermidade tropical negligenciada que afeta mais de 10 milhões de pessoas no mundo (Bonney e Engman, 2015). Essa doença é caracterizada pela infiltração do miocárdio por células mononucleares, incluindo linfócitos T CD4+, juntamente com edema, destruição miofibrilar, e fibrose. A resposta imune sistêmica complexa e multifacetada que se desenvolve, acaba por manter parasitemia em níveis mais baixos. Em nosso experimento camundongos C57BL/6 foram infectados com *T.cruzi*, cepa Y, concentração 1×10^4 . No modelo de miocardite aguda, observamos uma nítida diferença ao comparar o grupo tratado com o não-tratado. O grupo exposto a antígenos cardíacos antes da infecção apresentou um aumento no percentual da população de linfócitos T CD8+ (42,03% vs 8,88% no grupo infectado). Comparando o grupo infectado não-tratado com o grupo infectado tratado com extrato, constatamos também que células T ativadas de fenótipo CD44^{high}CD62L⁻CD197^{-/low} apresentaram uma redução importante em células CD4+, de 88,3% para 11,7%, e em células CD8+, diminuindo de 94,6% para 14,3% (Fig. 13 e 14). Adicionalmente, 44,1% das células T CD4+ ativadas (CD44^{high}CD62L⁻) apresentavam o fenótipo CD197^{high} no grupo tratado, constituindo o perfil de células T de memória efetoras. Esses achados mostram que o tratamento foi induzir mudanças no fenótipo de linfócitos T cardíacos, não se enquadrando mais no perfil de células ativadas, com o fenótipo CD44^{low}CD62L⁻CD197^{-/low}, principalmente em células CD8+. No caso de células CD4+, o fenótipo observado também não se enquadra em perfis previamente estabelecidos, pois as células aumentaram a expressão de CD197+, mas perderam CD44^{high}, não se configurando como um perfil de células de memória central. Estes dados mostram uma alteração fenotípica importante que pode se refletir em alterações funcionais. Ensaio *in vitro* com células cardíacas purificadas de animais infectados e estudos de sobrevivência para avaliar o impacto dessas mudanças não puderam ser realizados.

Células T CD8+ de memória efetoras e de memória central podem ser distinguidas pela expressão de moléculas de superfície CD197 e secreção de

IL-2. Classicamente, as células T CD8⁺ de memória efetoras são negativas ou expressam baixos níveis dos receptores homing CD62L, CD197 e produzem baixas quantidades de IL-2. Células T de memória central expressam níveis mais elevados de CD62L e são CD197^{high}, apresentando níveis aumentados de IL-2. Por outro lado, as células T CD4⁺ de memória podem ter algumas variações nesse perfil devido a uma maior complexidade, levando em conta as diversas subpopulações de T helper que podem estar presentes. A histologia do tecido cardíaco desses camundongos evidenciou uma diferença qualitativa interessante. A análise histopatológica do grupo infectado e tratado com extrato apresentou um infiltrado leucocitário mais difuso e com menos focos inflamatórios, enquanto que o grupo infectado e não tratado mostrou uma infiltração de leucócitos mais exuberante com muitos focos. Na estereologia (fig.17), observamos diferenças significativas apenas comparando grupos infectados ao grupo controle, tanto em relação a quantidade de núcleos quanto à presença de vasos, o que confirma que a infecção induzida experimentalmente foi eficaz ao promover miocardite aguda, assim como previsto nesse modelo. No entanto, o tratamento parece não ter tido efeito em termos quantitativos, apenas qualitativos, sobre a miocardite.

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS DE ANÁLISE

Em relação as limitações, cabe ressaltar diversas dificuldades encontradas em realizar esse projeto. Primeiramente, a escolha do modelo crônico exigiu um longo tempo de acompanhamento, de mais de 1 ano, estando o mesmo sujeito a variações rotineiras do cotidiano do biotério, como falta de água ou ração, assim como variações mais extremas, como epidemias ou catástrofes naturais. Apesar de dificuldades econômicas em certos períodos terem tido impacto no cotidiano do biotério, isso não afetou os animais envolvidos no modelo crônico. Por outro lado, houve uma epidemia no período que os primeiros grupos tratados do modelo crônico completavam 12 meses de idade, tendo a mesma dizimado boa parte dos animais do biotério, incluindo os

envolvidos no estudo. Após o devido tratamento do biotério e a compra de novos animais para o estudo, não houveram mais incidentes.

Outro fator que limitou a obtenção de mais dados do estudo foi a baixa disponibilidade para compra de biomarcadores específicos para ratos, como marcadores celulares de citometria e enzimas cardíacas (BNP e troponina) para dosagem sérica. Além disso, algumas análises foram prejudicadas devido ao citometro da plataforma que estava sendo usado em todas as análises anterior ter entrado em manutenção por cerca de 8 meses. Isso fez com que alguns experimentos fossem adiados e algumas análises deixarem de ser feitas.

As perspectivas são de estabelecer uma linha de pesquisa utilizando o conhecimento adquirido a partir dos achados desse estudo. Os estudos com o modelo crônico devem ser realizados com um modelo que exija um tempo menor de espera, utilizando por exemplo ratos hipertensos que desenvolvem insuficiência cardíaca de forma precoce (ratos SHHF – *spontaneously hypertensive heart failure*), que infelizmente não estão disponíveis no Brasil. Os estudos com modelo agudo deverão ser repetidos a fim de aumentar a consistência dos achados, assim como elaborar e realizar uma análise mais profunda e detalhada dos mecanismos que poderiam estar participando nesse processo.

7. CONCLUSÕES

Em nosso estudo, conseguimos observar uma mudança de fenótipo ao tratar machos SHR com extrato de proteínas cardíacas por via oral e intraperitoneal, com um aumento em linfócitos CD4+CD25+(13,30%) e uma diminuição em linfócitos CD4+TCR $\gamma\delta$ (3,19%) e CD28+ (5,23%), enquanto se mantêm similares quanto a linfócitos CD3+CD4+ (5,78%) e linfócitos CD3+CD4+CD44+ (2,31%). A única subpopulação que mostrou diferença estatisticamente significativa foi a de linfócitos CD4+CD25+.

No modelo de miocardite chagásica aguda, o grupo tratado mostrou um percentual maior de linfócitos T CD8+, com um perfil de ativação diferente do grupo infectado. Além disso, a avaliação dos cortes de tecido cardíaco por H&E indicou que o grupo infectado tratado com extrato apresentou uma infiltração inflamatória mais difusa e com menos focos, em contraste com o grupo infectado e não tratado, que mostra uma infiltração inflamatória mais exuberante com muitos focos

O sistema imune inato e adaptativo mostram uma interação íntima com o coração e suas estruturas. O modelo crônico de cardiopatia apresenta características de uma cardite de baixo grau, com alterações cardíacas estruturais e infiltrado inflamatório; e, ao se induzir tolerância oral a antígenos cardíacos observamos uma mudança no fenótipo do infiltrado leucocitário. A exposição dos animais a antígenos cardíacos no modelo de cardite chagásica aguda parece induzir a migração de células T CD8+, podendo ter impacto na recuperação da fase aguda da miocardite e na sobrevivência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALFERINK, J. et al. Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. **J Exp Med**, v. 197, n. 5, p. 585-99, Mar 03 2003. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615900>>.

ALTARA, R. et al. Left Ventricular Dysfunction and CXCR3 Ligands in Hypertension: From Animal Experiments to a Population-Based Pilot Study. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0141394, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26506526>>.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077613>>.

ANDRE, C. et al. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen-antibody complexes. **J Exp Med**, v. 142, n. 6, p. 1509-19, Dec 01 1975. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1104748>>.

ANDRESEN, M. C.; YANG, M. Arterial baroreceptor resetting: contributions of chronic and acute processes. **Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl**, v. 15, p. 19-30, 1989. ISSN 0143-9294 (Print)

0143-9294 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2805444>>.

ARAKAWA, T. et al. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. **Nat Biotechnol**, v. 16, n. 10, p. 934-8, Oct 1998. ISSN 1087-0156 (Print)

1087-0156 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788349>>.

ARAMAKI, Y. et al. Induction of oral tolerance after feeding of ragweed pollen extract in mice. **Immunol Lett**, v. 40, n. 1, p. 21-5, Apr 1994. ISSN 0165-2478 (Print)

0165-2478 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927509>>.

ARGUELLO, R. J. et al. Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e2989, Aug 2014. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144227>>.

ASHERSON, G. L. et al. Production of immunity and unresponsiveness in the mouse by feeding contact sensitizing agents and the role of suppressor cells in the peyer's patches, mesenteric lymph nodes and other lymphoid tissues. **Cell Immunol**, v. 33, n. 1, p. 145-55, Sep 1977. ISSN 0008-8749 (Print)

0008-8749 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/302759>>.

AVLAS, O. et al. Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 7, p. 1895-909, Oct 01 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21126202>>.

BA, D. et al. Restoration of T cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts. **J Immunol**, v. 128, n. 3, p. 1211-6, Mar 1982. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6120194>>.

BATAILLARD, A. et al. Antihypertensive effect of an immunosuppressive agent, cyclophosphamide, in genetically hypertensive rats of the Lyon strain. **Int J Immunopharmacol**, v. 11, n. 4, p. 377-84, 1989. ISSN 0192-0561 (Print)

0192-0561 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2777432>>.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **[Manual de técnicas para histologia normal e patológica]**. Edusp, 1975.

BENDICH, A.; BELISLE, E. H.; STRAUSSER, H. R. Immune system modulation and its effect on the blood pressure of the spontaneously hypertensive male and female rat. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 99, n. 2, p. 600-7, Mar 31 1981. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6972216>>.

BESREDKA, A. Sexième memoire de l'anaphylaxie latique. **Ann. Inst. Pasteur Lille**, v. 23, p. 166, 1909.

BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. Actively acquired tolerance of foreign cells. **Nature**, v. 172, n. 4379, p. 603-6, Oct 03 1953. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13099277> >.

BOCCHI, E. A. et al. [III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure]. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 1 Suppl 1, p. 3-70, 2009. ISSN 1678-4170 (Electronic)

0066-782X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20963312> >.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease: Looking Back, Looking Ahead. **Am J Pathol**, Apr 6 2015. ISSN 1525-2191 (Electronic)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857229> >.

BORN, W. et al. Recognition of heat shock proteins and gamma delta cell function. **Immunol Today**, v. 11, n. 2, p. 40-3, Feb 1990. ISSN 0167-5699 (Print)

0167-5699 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2139782> >.

BOUDINA, S. et al. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. **Circulation**, v. 119, n. 9, p. 1272-83, Mar 10 2009. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19237663> >.

BOZKURT, B.; MANN, D. L.; DESWAL, A. Biomarkers of inflammation in heart failure. **Heart Fail Rev**, v. 15, n. 4, p. 331-41, Jul 2010. ISSN 1573-7322 (Electronic)

1382-4147 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363700> >.

CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in Trypanosoma cruzi infection. **Pathog Dis**, v. 73, n. 9, p. ftv082, Dec 2015. ISSN 2049-632X (Electronic)

2049-632X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26438729> >.

CARVALHO, C. R. et al. Indirect effects of oral tolerance in mice. **Scand J Immunol**, v. 39, n. 6, p. 533-8, Jun 1994. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8009172> >.

CHASE, M. W. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity. **J Bacteriol**, v. 51, p. 643, May 1946a. ISSN 0021-9193 (Print)

0021-9193 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20987083> >.

_____. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 61, p. 257-9, Mar 1946b. ISSN 0037-9727 (Print)

0037-9727 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21024163> >.

CHUNG, E. S. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. **Circulation**, v. 107, n. 25, p. 3133-40, Jul 01 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796126> >.

CLAESSEN, A. M. et al. Reversal of mucosal tolerance by subcutaneous administration of interleukin-12 at the site of attempted sensitization. **Immunology**, v. 88, n. 3, p. 363-7, Jul 1996. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774351> >.

COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. **J Am Coll Cardiol**, v. 35, n. 3, p. 569-82, Mar 01 2000. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716457> >.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-82, May 2015. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466622> >.

CROWLEY, S. D. et al. Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 4, p. R1089-97, Apr 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147609> >.

CUNHA, A. P. et al. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. **Cell Immunol**, v. 258, n. 2, p. 152-60, 2009. ISSN 1090-2163 (Electronic)

0008-8749 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477435> >.

CUSPIDI, C. et al. Prevalence of electrocardiographic left ventricular hypertrophy in human hypertension: an updated review. **J Hypertens**, v. 30, n. 11, p. 2066-73, Nov 2012. ISSN 1473-5598 (Electronic)

0263-6352 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914541> >.

CUSPIDI, C. et al. Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: an updated review of echocardiographic studies. **J Hum Hypertens**, v. 26, n. 6, p. 343-9, Jun 2012. ISSN 1476-5527 (Electronic)

0950-9240 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22113443> >.

DA CUNHA, A. P.; VAZ, N. M.; CARVALHO, C. R. Study of oral tolerance and its indirect effects in adoptive cell transfer experiments. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1029, p. 321-7, Dec 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681771> >.

DA SILVA, A. C. et al. A 24,000 MW Trypanosoma cruzi antigen is a B-cell activator. **Immunology**, v. 94, n. 2, p. 189-96, Jun 1998. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9741340> >.

DAHL, C. P. et al. Increased production of CXCL16 in experimental and clinical heart failure: a possible role in extracellular matrix remodeling. **Circ Heart Fail**, v. 2, n. 6, p. 624-32, Nov 2009. ISSN 1941-3297 (Electronic)

1941-3289 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919988> >.

DASGUPTA, A. et al. Oral administration of unmodified colonic but not small intestinal antigens protects rats from hapten-induced colitis. **Clin Exp Immunol**, v. 125, n. 1, p. 41-7, Jul 2001. ISSN 0009-9104 (Print)

0009-9104 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11472424> >.

DE MEIS, J. et al. Trypanosoma cruzi Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. **Front Immunol**, v. 4, p. 216, 2013. ISSN 1664-3224 (Print)

1664-3224 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23898334> >.

DE MIGUEL, C. et al. T lymphocytes mediate hypertension and kidney damage in Dahl salt-sensitive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 4, p. R1136-42, Apr 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147611> >.

DELAUGHTER, M. C. et al. Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac hypertrophy in transgenic mice. **FASEB J**, v. 13, n. 14, p. 1923-9, Nov 1999. ISSN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544175> >.

DIAS, E. et al. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v. 14, n. 6, p. 1035-60, Dec 1956. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13383798> >.

DIAS, J. C.; DIAS, E. [Chagas' disease. General findings in 67 cases of acute Chagas' disease observed by the graduate Dr. Emmanuel Dias (Oswaldo Cruz Institute), Bambui, MG from 1955-67]. **Hospital (Rio J)**, v. 73, n. 6, p. 1935-45, Jun 1968. ISSN 0018-5469 (Print)

0018-5469 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4977000> >.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 1, p. 89-105, Jul 1998. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9764192> >.

DOS SANTOS VIRGILIO, F. et al. CD8(+) T cell-mediated immunity during Trypanosoma cruzi infection: a path for vaccine development? **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 243786, 2014. ISSN 1466-1861 (Electronic)

0962-9351 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104879> >.

DRAZNER, M. H. The progression of hypertensive heart disease. **Circulation**, v. 123, n. 3, p. 327-34, Jan 25 2011. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21263005> >.

DRAZNER, M. H. et al. Left ventricular hypertrophy is more prevalent in blacks than whites in the general population: the Dallas Heart Study. **Hypertension**, v. 46, n. 1, p. 124-9, Jul 2005. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939807> >.

DUNLAY, S. M.; ROGER, V. L. Understanding the epidemic of heart failure: past, present, and future. **Curr Heart Fail Rep**, v. 11, n. 4, p. 404-15, Dec 2014. ISSN 1546-9549 (Electronic)

1546-9530 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182014> >.

DZIELAK, D. J. Immune mechanisms in experimental and essential hypertension. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 2, p. R459-67, Mar 1991. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2000994> >.

ERIKSSON, U. et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. **Nat Med**, v. 9, n. 12, p. 1484-90, Dec 2003. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625544> >.

FAGARD, R. et al. Noninvasive assessment of seasonal variations in cardiac structure and function in cyclists. **Circulation**, v. 67, n. 4, p. 896-901, Apr 1983. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6825246> >.

FARIA, A. M. et al. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. **Immunology**, v. 78, n. 1, p. 147-51, Jan 1993. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8436401> >.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol Rev**, v. 206, p. 232-59, Aug 2005. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16048553> >.

FERNANDEZ, E. R. et al. Altered distribution of peripheral blood memory B cells in humans chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104951, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111833> >.

FISHMAN-LOBELL, J.; FRIEDMAN, A.; WEINER, H. L. Different kinetic patterns of cytokine gene expression in vivo in orally tolerant mice. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 11, p. 2720-4, Nov 1994. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957564> >.

FUKUNAGA, T. et al. Expression of interferon-gamma and interleukin-4 production in CD4+ T cells in patients with chronic heart failure. **Heart Vessels**, v. 22, n. 3, p. 178-83, May 2007. ISSN 0910-8327 (Print)

0910-8327 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17533522> >.

GIRALDO, N. A. et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1294, Aug 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21886854> >.

GLAISTER, J. R. Some effects of oral administration of oxazolone to mice. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 45, n. 6, p. 828-43, 1973. ISSN 0020-5915 (Print)

0020-5915 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4796935> >.

GRIENGLING, K. K.; LASSEGUE, B.; ALEXANDER, R. W. The vascular angiotensin (AT1) receptor. **Thromb Haemost**, v. 70, n. 1, p. 188-92, Jul 1 1993. ISSN 0340-6245 (Print)

0340-6245 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8236101> >.

GUEDES, P. M. et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 4, p. e1630, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22545173>>.

GULLESTAD, L. et al. Intravenous immunoglobulin does not reduce left ventricular remodeling in patients with myocardial dysfunction during hospitalization after acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 1, p. 212-8, Sep 20 2013. ISSN 1874-1754 (Electronic)

0167-5273 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046599>>.

GUNDERSEN, H. J. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 5, p. 379-94, May 1988. ISSN 0903-4641 (Print)

0903-4641 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3288247>>.

GUO, F. et al. Trends in prevalence, awareness, management, and control of hypertension among United States adults, 1999 to 2010. **J Am Coll Cardiol**, v. 60, n. 7, p. 599-606, Aug 14 2012. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796254>>.

GUZIK, T. J. et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. **J Exp Med**, v. 204, n. 10, p. 2449-60, Oct 1 2007. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875676>>.

HAAS, G. J. et al. Echocardiographic characterization of left ventricular adaptation in a genetically determined heart failure rat model. **Am Heart J**, v. 130, n. 4, p. 806-11, Oct 1995. ISSN 0002-8703 (Print)

0002-8703 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7572590>>.

HAIDER, A. W. et al. Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. **J Am Coll Cardiol**, v. 32, n. 5, p. 1454-9, Nov 1998. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809962> >.

HAN, Y. L. et al. Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN-gamma and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35506, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22567105> >.

HANSON, D. G. Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I. Priming and tolerance in newborns. **J Immunol**, v. 127, n. 4, p. 1518-24, Oct 1981. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6168694> >.

HANSON, D. G. et al. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 55, n. 1-6, p. 526-32, 1977. ISSN 0020-5915 (Print)

0020-5915 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/591113> >.

HANSON, D. G. et al. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Effects of prior passive and active immunization. **J Immunol**, v. 122, n. 6, p. 2261-6, Jun 1979. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/448128> >.

HARRISON, D. G. et al. Inflammation, immunity, and hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 132-40, Feb 2011. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149826> >.

HEAD, G. A. Cardiac baroreflexes and hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 21, n. 10, p. 791-802, Oct 1994. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7867230> >.

HENG, M. K.; HENG, M. C. Heat-shock protein 65 and activated gamma/delta T cells in injured arteries. **Lancet**, v. 344, n. 8927, p. 921-3, Oct 01 1994. ISSN 0140-6736 (Print)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7934348> >.

HEREMANS, J. F.; HEREMANS, M. T.; SCHULTZE, H. E. Isolation and description of a few properties of the beta 2A-globulin of human serum. **Clin Chim Acta**, v. 4, n. 1, p. 96-102, Jan 1959. ISSN 0009-8981 (Print)

0009-8981 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13629856> >.

HILL, J. A.; OLSON, E. N. Cardiac plasticity. **N Engl J Med**, v. 358, n. 13, p. 1370-80, Mar 27 2008. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367740> >.

HINGLAIS, N. et al. Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats. **Lab Invest**, v. 70, n. 2, p. 286-94, Feb 1994. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8139269> >.

HOHL, C. M. et al. Effects of obesity and hypertension on ventricular myocytes: comparison of cells from adult SHHF/Mcc-cp and JCR:LA-cp rats. **Cardiovasc Res**, v. 27, n. 2, p. 238-42, Feb 1993. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386063> >.

HUBER, S. A. Heat-shock protein induction in adriamycin and picornavirus-infected cardiocytes. **Lab Invest**, v. 67, n. 2, p. 218-24, Aug 1992. ISSN 0023-6837 (Print)

0023-6837 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1323730> >.

_____. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, p. 579-87, Feb 2000. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728379> >.

IAMS, S. G.; WEXLER, B. C. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. **J Lab Clin Med**, v. 94, n. 4, p. 608-16, Oct 1979. ISSN 0022-2143 (Print)

0022-2143 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/225399> >.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Estimativas da população**. <http://www.ibge.gov.br> 2006.

JAIN, A. et al. Diagnostic and prognostic utility of electrocardiography for left ventricular hypertrophy defined by magnetic resonance imaging in relationship to ethnicity: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Am Heart J**, v. 159, n. 4, p. 652-8, Apr 2010. ISSN 1097-6744 (Electronic)

0002-8703 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362725> >.

JANCZEWSKI, A. M. et al. Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF-alpha. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 284, n. 3, p. H960-9, Mar 2003. ISSN 0363-6135 (Print)

0363-6135 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578819> >.

JASTRZEBSKI, M. et al. Increased levels of inflammatory markers in hypertensives with target organ damage. **Kardiol Pol**, v. 64, n. 8, p. 802-9; discussion 810-1, Aug 2006. ISSN 0022-9032 (Print)

0022-9032 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981055> >.

KAGNOFF, M. F. Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. II. Suppression of delayed-type hypersensitivity reactions. **J Immunol**, v. 120, n. 5, p. 1509-13, May 1978. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/659859> >.

KANELLAKIS, P. et al. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells suppress cardiac fibrosis in the hypertensive heart. **J Hypertens**, v. 29, n. 9, p. 1820-8, Sep 2011. ISSN 1473-5598 (Electronic)

0263-6352 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21785365> >.

KANNEL, W. B.; COBB, J. Left ventricular hypertrophy and mortality--results from the Framingham Study. **Cardiology**, v. 81, n. 4-5, p. 291-8, 1992. ISSN 0008-6312 (Print)

0008-6312 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1301257> >.

KAUR, K. et al. Biology of TNFalpha and IL-10, and their imbalance in heart failure. **Heart Fail Rev**, v. 14, n. 2, p. 113-23, Jun 2009. ISSN 1573-7322 (Electronic)

1382-4147 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18712475> >.

KIM, J. et al. Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. **Mol Endocrinol**, v. 22, n. 11, p. 2531-43, Nov 2008. ISSN 0888-8809 (Print)

0888-8809 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18801929> >.

KUWAHARA, F. et al. Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? **Hypertension**, v. 43, n. 4, p. 739-45, Apr 2004. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967845> >.

KVAKAN, H. et al. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. **Circulation**, v. 119, n. 22, p. 2904-12, Jun 09 2009. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470887> >.

LANG, R. M. et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 18, n. 12, p. 1440-63, Dec 2005. ISSN 1097-6795 (Electronic)

0894-7317 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16376782> >.

LAROUMANIE, F. et al. CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. **Circulation**, v. 129, n. 21, p. 2111-24, May 27 2014. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657994> >.

LEGRICE, I. J. et al. Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 303, n. 11, p. H1353-65, Dec 1 2012. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23001837> >.

LEON, J. S.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. **J Immunol**, v. 171, n. 8, p. 4271-7, Oct 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14530351> >.

LEVINE, B. et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **N Engl J Med**, v. 323, n. 4, p. 236-41, Jul 26 1990. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2195340> >.

LEVY, D. et al. The progression from hypertension to congestive heart failure. **JAMA**, v. 275, n. 20, p. 1557-62, May 22-29 1996. ISSN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8622246> >.

LIU, L. et al. Trends in the prevalence of hospitalization attributable to hypertensive diseases among United States adults aged 35 and older from 1980 to 2007. **Am J Cardiol**, v. 112, n. 5, p. 694-9, Sep 01 2013. ISSN 1879-1913 (Electronic)

0002-9149 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23726180> >.

MA, S. W. et al. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. **Nat Med**, v. 3, n. 7, p. 793-6, Jul 1997. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212110> >.

MADY, C.; NACRUTH, R. Natural history of chronic Chagas' heart disease: prognosis factors. **Sao Paulo Med J**, v. 113, n. 2, p. 791-6, Mar-Apr 1995. ISSN 1516-3180 (Print)

1516-3180 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650478> >.

MAGALHAES, L. M. et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **J Infect Dis**, v. 207, n. 4, p. 661-5, Feb 15 2013. ISSN 1537-6613 (Electronic)

0022-1899 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204182> >.

MAHMOUD, A. I. et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 249-253, May 09 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594737> >.

MAILLET, M.; VAN BERLO, J. H.; MOLKENTIN, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 1, p. 38-48, Jan 2013. ISSN 1471-0080 (Electronic)

1471-0072 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258295> >.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. Chagas Heart Disease: An Update. **Am J Med**, v. 128, n. 11, p. 1251 e7-9, Nov 2015. ISSN 1555-7162 (Electronic)

0002-9343 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052027> >.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-86, Dec 2003. ISSN 0001-3765 (Print)

0001-3765 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14605681> >.

MANN, D. L. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. **Circ Res**, v. 91, n. 11, p. 988-98, Nov 29 2002. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456484> >.

MANN, D. L. et al. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). **Circulation**, v. 109, n. 13, p. 1594-602, Apr 06 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023878> >.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 06 2007. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339569> >.

MARVAR, P. J.; GORDON, F. J.; HARRISON, D. G. Blood pressure control: salt gets under your skin. **Nat Med**, v. 15, n. 5, p. 487-8, May 2009. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424204> >.

MARVAR, P. J. et al. T lymphocytes and vascular inflammation contribute to stress-dependent hypertension. **Biol Psychiatry**, v. 71, n. 9, p. 774-82, May 1 2012. ISSN 1873-2402 (Electronic)

0006-3223 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361077> >.

MCCUNE, S. A.; BAKER, P. B.; STILLS, H. F. SHHF / Mcc-cp rat: model of obesity, noninsulin-dependent diabetes, and congestive heart failure. **ILAR News** n. 32, p. 23-27, 1990.

MCMURRAY, J. J. et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. **Eur J Heart Fail**, v. 14, n. 8, p. 803-69, Aug 2012. ISSN 1879-0844 (Electronic)

1388-9842 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828712> >.

MELAMED, D. et al. Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. **Int Immunol**, v. 8, n. 5, p. 717-24, May 1996. ISSN 0953-8178 (Print)

0953-8178 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8671659> >.

MELAMED, D.; FRIEDMAN, A. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 4, p. 935-42, Apr 1993. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458379> >.

_____. In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 9, p. 1974-81, Sep 1994. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8088317> >.

MENDIS, S. et al. World Health Organization (WHO) and International Society of Hypertension (ISH) risk prediction charts: assessment of cardiovascular risk

for prevention and control of cardiovascular disease in low and middle-income countries. **J Hypertens**, v. 25, n. 8, p. 1578-82, Aug 2007. ISSN 0263-6352 (Print)

0263-6352 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620952> >.

MIGITA, K.; OCHI, A. Induction of clonal anergy by oral administration of staphylococcal enterotoxin B. **Eur J Immunol**, v. 24, n. 9, p. 2081-6, Sep 1994. ISSN 0014-2980 (Print)

0014-2980 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8088329> >.

MILLER, S. D.; HANSON, D. G. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin. **J Immunol**, v. 123, n. 5, p. 2344-50, Nov 1979. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/90707> >.

MINISTERIO DA SAUDE. **Datasus. Sistema Único de Saúde – Brasil. Sistema de Informações hospitalares do SUS (SIH/SUS)**. .
<http://www.datasus.org.br/> 2007.

MINOPRIO, P. M. et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. **Scand J Immunol**, v. 24, n. 6, p. 661-8, Dec 1986. ISSN 0300-9475 (Print)

0300-9475 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3099379> >.

MONTEIRO-LEAL, L. **Fundamentos de Microscopia**. EdUERJ, 2000.

MOSER, M.; HEBERT, P. R. Prevention of disease progression, left ventricular hypertrophy and congestive heart failure in hypertension treatment trials. **J Am Coll Cardiol**, v. 27, n. 5, p. 1214-8, Apr 1996. ISSN 0735-1097 (Print)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609345> >.

MULLER, D. N.; KVAKAN, H.; LUFT, F. C. Immune-related effects in hypertension and target-organ damage. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 20, n. 2, p. 113-7, Mar 2011. ISSN 1535-3842 (Electronic)

1062-4821 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245763> >.

NAGUEH, S. F. et al. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 22, n. 2, p. 107-33, Feb 2009. ISSN 1097-6795 (Electronic)

0894-7317 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19187853> >.

NERI SERNERI, G. G. et al. Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. **Circ Res**, v. 89, n. 11, p. 977-82, Nov 23 2001. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717153> >.

NEURATH, M. F. et al. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. **J Exp Med**, v. 183, n. 6, p. 2605-16, Jun 01 1996. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8676081> >.

NICOLETTI, A. et al. Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. **Cardiovasc Res**, v. 32, n. 6, p. 1096-107, Dec 1996. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015412> >.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror-gammat, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 914326, 2014. ISSN 1466-1861 (Electronic)

0962-9351 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25152568> >.

NOYA, B. A. et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 377-86, May 2015. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946155> >.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 27, p. 282-93, Mar 1963. ISSN 0047-1828 (Print)

0047-1828 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13939773> >.

OLIVEIRA, R. P. et al. Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long-lasting effects. **J Immunol Methods**, v. 421, p. 36-43, Jun 2015. ISSN 1872-7905 (Electronic)

0022-1759 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707356> >.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE. **World Health Statistics 2009**. http://www.who.int/entity/whosis/whostat/EN_WHS09_Table2.pdf 2010.

PARK, S. et al. Verapamil accelerates the transition to heart failure in obese, hypertensive, female SHHF/Mcc-fa(cp) rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 29, n. 6, p. 726-33, Jun 1997. ISSN 0160-2446 (Print)

0160-2446 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234652> >.

PFEFFER, J. M.; PFEFFER, M. A.; FROHLICH, E. D. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J Lab Clin Med**, v. 78, n. 6, p. 957-62, Dec 1971. ISSN 0022-2143 (Print)

0022-2143 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5131859> >.

PINTO, A. Y. et al. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Rev Panam Salud Publica**, v. 25, n. 1, p. 77-83, Jan 2009. ISSN 1020-4989 (Print)

1020-4989 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19341528> >.

PIRO, M. et al. Sex-related differences in myocardial remodeling. **J Am Coll Cardiol**, v. 55, n. 11, p. 1057-65, Mar 16 2010. ISSN 1558-3597 (Electronic)

0735-1097 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223363> >.

PORRELLO, E. R. et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. **Science**, v. 331, n. 6020, p. 1078-80, Feb 25 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350179> >.

PORRELLO, E. R. et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 1, p. 187-92, Jan 02 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23248315> >.

RAMOS, G. C. et al. The autoimmune nature of post-infarct myocardial healing: oral tolerance to cardiac antigens as a novel strategy to improve cardiac healing. **Autoimmunity**, v. 45, n. 3, p. 233-44, May 2012. ISSN 1607-842X (Electronic)

0891-6934 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235812> >.

RAMOS, G. C. et al. Myocardial aging as a T-cell-mediated phenomenon. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 12, p. E2420-E2429, Mar 21 2017. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28255084> >.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

RICHMAN, L. K. et al. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. **J Immunol**, v. 121, n. 6, p. 2429-34, Dec 1978. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/82585> >.

RIQUELME, C. A. et al. Fatty acids identified in the Burmese python promote beneficial cardiac growth. **Science**, v. 334, n. 6055, p. 528-31, Oct 28 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034436> >.

ROCHA RODRIGUES, D. B. et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 361730, 2012. ISSN 1740-2530 (Electronic)

1740-2522 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811738> >.

RODRIGUEZ-ITURBE, B. et al. Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 282, n. 2, p. F191-201, Feb 2002. ISSN 1931-857X (Print)

1522-1466 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788432> >.

ROSAMOND, W. et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 117, n. 4, p. e25-146, Jan 29 2008. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086926> >.

RUBEN, Z. et al. A potential model for a human disease: spontaneous cardiomyopathy-congestive heart failure in SHR/N-cp rats. **Hum Pathol**, v. 15, n. 10, p. 902-3, Oct 1984. ISSN 0046-8177 (Print)

0046-8177 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6479970> >.

SABA, E. S. et al. Anti-Trypanosoma cruzi cross-reactive antibodies detected at high rate in non-exposed individuals living in non-endemic regions: seroprevalence and association to other viral serologies. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74493, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069315> >.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol Rev**, v. 182, p. 18-32, Aug 2001. ISSN 0105-2896 (Print)

0105-2896 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722621> >.

SAYEGH, M. H. et al. Down-regulation of the immune response to histocompatibility antigens and prevention of sensitization by skin allografts by orally administered alloantigen. **Transplantation**, v. 53, n. 1, p. 163-6, Jan 1992. ISSN 0041-1337 (Print)

0041-1337 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733066> >.

SCHEUER, J. et al. Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. **J Clin Invest**, v. 70, n. 6, p. 1300-5, Dec 1982. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6217215> >.

SCIAMMAS, R. et al. Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. **J Immunol**, v. 152, n. 11, p. 5392-7, Jun 01 1994. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8189058> >.

SEABERG, E. C. et al. Association between highly active antiretroviral therapy and hypertension in a large cohort of men followed from 1984 to 2003. **AIDS**, v. 19, n. 9, p. 953-60, Jun 10 2005. ISSN 0269-9370 (Print)

0269-9370 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905677> >.

SHARFE, N. et al. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3168-71, Apr 01 1997. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096364>>.

SHEVACH, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 6, p. 389-400, Jun 2002. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093005>>.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 6, p. 845-52, Mar 2012. ISSN 1537-6591 (Electronic)

1058-4838 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238161>>.

SHIOI, T. et al. Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload. **Circ Res**, v. 81, n. 5, p. 664-71, Nov 1997. ISSN 0009-7330 (Print)

0009-7330 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351439>>.

SHIOTA, N. et al. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. **J Hypertens**, v. 21, n. 10, p. 1935-44, Oct 2003. ISSN 0263-6352 (Print)

0263-6352 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508201>>.

SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012. ISSN 1553-7374 (Electronic)

1553-7366 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22532799>>.

SIVASUBRAMANIAN, N. et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. **Circulation**, v. 104, n. 7, p. 826-31, Aug 14 2001. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502710> >.

SMITH, R. T.; BRIDGES, R. A. Immunological unresponsiveness in rabbits produced by neonatal injection of defined antigens. **J Exp Med**, v. 108, n. 2, p. 227-50, Aug 01 1958. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13563758> >.

SMITH, S. C.; ALLEN, P. M. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. **J Immunol**, v. 147, n. 7, p. 2141-7, Oct 01 1991. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1918949> >.

STEVENS, S. M.; REINIER, K.; CHUGH, S. S. Increased left ventricular mass as a predictor of sudden cardiac death: is it time to put it to the test? **Circ Arrhythm Electrophysiol**, v. 6, n. 1, p. 212-7, Feb 2013. ISSN 1941-3084 (Electronic)

1941-3084 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23424223> >.

STOKES, C. R. et al. The immune response of mice to bacterial antigens given by mouth. **Immunology**, v. 38, n. 3, p. 497-502, Nov 1979. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/391697> >.

STROBEL, S.; FERGUSON, A. Persistence of oral tolerance in mice fed ovalbumin is different for humoral and cell-mediated immune responses. **Immunology**, v. 60, n. 2, p. 317-8, Feb 1987. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3817875> >.

SUKO, M. et al. Oral immunotherapy may induce T cell anergy. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 107, n. 1-3, p. 278-81, May-Jun 1995. ISSN 1018-2438 (Print)

1018-2438 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7613150> >.

SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 215-62, Jan 1999. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922372> >.

TAKEICHI, N.; BA, D.; KOBAYASHI, H. Natural cytotoxic autoantibody against thymocytes in spontaneously hypertensive rats. **Cell Immunol**, v. 60, n. 1, p. 181-90, May 1 1981. ISSN 0008-8749 (Print)

0008-8749 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6972263> >.

TIPTON, A. J.; BABAN, B.; SULLIVAN, J. C. Female spontaneously hypertensive rats have greater renal anti-inflammatory T lymphocyte infiltration than males. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 4, p. R359-67, Aug 15 2012. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761180> >.

TITUS, R. G.; CHILLER, J. M. Orally induced tolerance. Definition at the cellular level. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 65, n. 3, p. 323-38, 1981. ISSN 0020-5915 (Print)

0020-5915 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6165688> >.

TOBAGUS, I. T.; THOMAS, W. R.; HOLT, P. G. Adjuvant costimulation during secondary antigen challenge directs qualitative aspects of oral tolerance induction, particularly during the neonatal period. **J Immunol**, v. 172, n. 4, p. 2274-85, Feb 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764696> >.

TORRE-AMIONE, G. et al. Results of a non-specific immunomodulation therapy in chronic heart failure (ACCLAIM trial): a placebo-controlled randomised trial. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 228-36, Jan 19 2008. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18207018> >.

TRAUB, E. Epidemiology of Lymphocytic Choriomeningitis in a Mouse Stock Observed for Four Years. **J Exp Med**, v. 69, n. 6, p. 801-17, May 31 1939. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870878> >.

VAZ, N. M. et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **J Allergy Clin Immunol**, v. 60, n. 2, p. 110-5, Aug 1977. ISSN 0091-6749 (Print)

0091-6749 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874210> >.

VERDOLIN, B. A. et al. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 2, p. 211-9, Feb 2001. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175496> >.

WEBER, K. T. The proinflammatory heart failure phenotype: a case of integrative physiology. **Am J Med Sci**, v. 330, n. 5, p. 219-26, Nov 2005. ISSN 0002-9629 (Print)

0002-9629 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284481> >.

WEIBEL, E. R.; KISTLER, G. S.; SCHERLE, W. F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **J Cell Biol**, v. 30, n. 1, p. 23-38, Jul 1966. ISSN 0021-9525 (Print)

0021-9525 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5338131> >.

WELLS, H. G. Studies on the Chemistry of Anaphylaxis (III). Experiments with Isolated Proteins, Especially those of the Hen's Egg. **J Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 147-171, 01 September 1911 1911.

YAMASAKI, N. et al. Heart failure in the elderly. **Intern Med**, v. 42, n. 5, p. 383-8, May 2003. ISSN 0918-2918 (Print)

0918-2918 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12793706> >.

ZABALGOITIA, M. et al. Impact of coronary artery disease on left ventricular systolic function and geometry in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy (the LIFE study). **Am J Cardiol**, v. 88, n. 6, p. 646-50, Sep 15 2001. ISSN 0002-9149 (Print)

0002-9149 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11564388> >.

ZANDBERGEN, H. R. et al. Macrophage depletion in hypertensive rats accelerates development of cardiomyopathy. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 14, n. 1, p. 68-75, Mar 2009. ISSN 1074-2484 (Print)

1074-2484 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168432> >.