

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARGARIDA PEREIRA SANTOS

**IMPACTO DO INIBIDOR DA VIA M-TOR RAPAMICINA NA SUSCEPTIBILIDADE À
INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI* DEPENDENTE DO ENVELHECIMENTO**

Alfenas /MG

2022

MARGARIDA PEREIRA SANTOS

**IMPACTO DO INIBIDOR DA VIA M-TOR RAPAMICINA NA SUSCEPTIBILIDADE À
INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI* DEPENDENTE DO ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação patógeno-hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes.

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Margarida Pereira.

Impacto do inibidor da via m-Tor rapamicina na susceptibilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi* dependente do envelhecimento / Margarida Pereira Santos. - Alfenas, MG, 2022.

52 f. : il. -

Orientador(a): Rômulo Dias Novaes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Envelhecimento. 2. Doença de Chagas. 3. Patologia cardiovascular. 4. Gerontologia experimental. 5. Parasitologia experimental. I. Novaes, Rômulo Dias, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

MARGARIDA PEREIRA SANTOS

“IMPACTO DO INIBIDOR DA VIA mTOR RAPAMICINA NA SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* DEPENDENTE DO ENVELHECIMENTO”

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 30 de junho de 2022.

Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Eliziária Cardoso dos Santos
Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Ivo Santana Caldas, Professor do Magistério Superior**, em 30/06/2022, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliziária Cardoso dos Santos, Usuário Externo**, em 30/06/2022, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rômulo Dias Novaes, Professor do Magistério Superior**, em 30/06/2022, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0763848** e o código CRC **46699009**.

Ao meu amado esposo, pela dedicação e auxílio para a realização desta etapa acadêmica da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Pro. Dr. Rômulo Dias Novaes, mestre insigne, que soube vislumbrar algum valor na minha pessoa e gentilmente aceitou em orientar-me no árduo mas gratificante caminho da ciência e da pesquisa, meus mais profundos agradecimentos. Sua orientação transformou-se em amizade, a qual prezo mais que tudo.

À Profa. Dra. Evelise Aline Soares, professora e amiga, sempre presente nos momentos de proventos e adversidades, minha eterna gratidão pelos sábios conselhos e por proporcionar ensinamentos ainda maiores no estágio docente.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pela oportunidade e acolhida.

Aos professores e funcionários do PPGCB, meus sinceros agradecimentos pelos saberes transmitidos e pelo alento no breve percurso.

À minha família e filha, que souberam me apoiar nos momentos de aflição e compreenderam minha ausência com incentivos e alegria, obrigada por fazerem parte da minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - processos APQ-01895- 16 e PPM-00077-18.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Pesquisa e Pós-graduação (CNPQ) - processos 303972/2017-3, 305093/ 2017-7 e 423594/2018-4,

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

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes.”

Sir Isaac Newton

RESUMO

Considerando a eficácia da rapamicina em aumentar a expectativa de vida e de saúde, reduzindo o declínio imunológico dependente do envelhecimento, comparamos a evolução da infecção por *Trypanosoma cruzi* e miocardite aguda em camundongos jovens e idosos não tratados e cronicamente tratados com esta droga. Cinco grupos de animais foram investigados: jovens não infectados e infectados, idosos não infectados e infectados com *Trypanosoma cruzi* não tratados e tratados com rapamicina (4 mg / kg a cada 3 dias) da 8ª à 96ª semanas de idade. Sete dias após o último tratamento, camundongos idosos foram inoculados com *T. cruzi*. Os animais jovens foram infectados com 8 semanas de idade. Camundongos idosos não tratados exibiram aumento de parasitemia, carga parasitária e miocardite, que foram associados à diminuição de níveis plasmáticos de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, imunoglobulina anti-*T. cruzi* (IgG total, IgG1 e IgG2a), expressão do gene da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e produção cardíaca de óxido nítrico (NO), bem como aumento da expressão do gene da *Arginase-1* e atividade da arginase (ARG) em comparação com animais jovens. Esses parâmetros melhoraram em camundongos idosos pré-tratados com rapamicina, que exibiram um melhor controle parasitológico, reduziram a inflamação cardíaca e danos microestruturais. Essas respostas foram associadas a um melhor equilíbrio entre os efetores Th1 e Th2, semelhante ao observado em animais jovens, incluindo uma ativação melhorada de citocinas Th1 e a via do iNOS que aumenta a biossíntese de NO, contrariando a ativação predominante da via da arginase em animais idosos não tratados. Assim, nossos resultados sugerem que o pré-tratamento crônico com rapamicina pode reduzir a imunossenescência em camundongos, contribuindo para prolongar a resistência ao parasita e reduzir a miocardite aguda em hospedeiro idoso infectado por *T. cruzi*.

Palavras-chave: Envelhecimento; Doença de Chagas; Patologia cardiovascular; Gerontologia experimental; Parasitologia experimental.

ABSTRACT

Considering the efficacy of rapamycin in increasing lifespan and healthspan, attenuating the aging-dependent immunological decline, we compared the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection and acute myocarditis in young and elderly mice untreated and chronically treated with this drug. Five animal groups were investigated: young uninfected and infected, elderly uninfected and infected with *Trypanosoma cruzi* untreated and treated with rapamycin (4 mg/kg every 3 days) from the 8th to the 96th week of age. Seven days after the last treatment, elderly mice were inoculated with *T. cruzi*. Young animals were infected at 8-weeks-old. Untreated elderly mice exhibited increase parasitemia, parasite load and myocarditis, which were associated to plasma levels down-regulation of IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, anti-*T. cruzi* immunoglobulin G (IgG) total, IgG1 and IgG2a, inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) gene expression and nitric oxide (NO) cardiac production, as well as upregulation in *Arginase-1* gene expression and arginase activity (ARG) compared to young animals. These parameters were improved in rapamycin-pretreated elderly mice, which exhibited a better parasitological control, reduced heart inflammation and microstructural damage. These responses were associated with a better balance between Th1 and Th2 effectors similar to that observed in young animals, including an improved activation of Th1 cytokines and the *iNOS* pathway that positively regulates NO biosynthesis, contradicting the predominant activation of the arginase pathway in untreated elderly animals. Thus, our findings suggest that chronic pretreatment with rapamycin can attenuate immunosenescence in mice, contributing to prolong parasite resistance and attenuate acute myocarditis in elderly host challenged by *T. cruzi*.

Keywords: Aging; Chagas disease; Cardiovascular pathology; Experimental gerontology; Experimental parasitology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Curva de parasitemia	26
Figura 2 -	Níveis plasmáticos de citocinas	28
Figura 3 -	Níveis plasmáticos de imunoglobulina anti-T. cruzi	29
Figura 4 -	Fotomicrografias do coração	30
Figura 5 -	Carga parasitária e distribuição de volume (Vv) de células intersticiais/inflamatórias, parênquima e estroma no coração	31
Figura 6 -	Níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (ANP) e a atividade cardíaca de N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO)	32
Figura 7 -	Expressão dos genes da Arginase-1 (Arg-1) e da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), a atividade da arginase (ARG) e níveis de óxido nítrico (NO) no tecido cardíaco	33

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Resultados de parasitemia	27
------------	---------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Peptídeo natriurético atrial
ARG-1	Expressão gênica da arginase
ARG	Arginase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
IFN- γ	Interferon-gama
IgGT	Imunoglobulina G total
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IgG2b	Imunoglobulina G2b
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
MPO	Mieloperoxidase
m-TOR	Via proteica alvo da rapamicina em mamíferos
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidase
NO	Óxido nítrico
PPGCB	Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

Σ	Somatório
\pm	Mais ou menos
$>$	Maior que
$<$	Menor que
\leq	Menor ou igual a

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	METODOLOGIA	17
3.1	Animais e aprovação ética	17
3.2	Tratamento com rapamicina	17
3.3	Infecção com <i>T. cruzi</i>	17
3.4	Parasitismo no sangue	18
3.5	Carga parasitária cardíaca	19
3.6	Imunoensaio de imunoglobulinas anti- <i>T. cruzi</i>	19
3.7	Imunoensaio de citocinas	20
3.8	Análise microestrutural do coração	20
3.9	Ensaio da N-acetil- β -D-glucosaminidase e mieloperoxidase	22
3.10	Imunoensaio do peptídeo natriurético atrial	22
3.11	Expressão da óxido nítrico-sintase induzida e da arginase	23
3.12	Ensaio do óxido nítrico	23
3.13	Ensaio da atividade da arginase	23
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	34
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS	44
	APÊNDICE A	52

1 INTRODUÇÃO

A atividade do sistema imunológico depende da idade e tem sido associada à longevidade (SIMON *et al.*, 2015; CSABA, 2019).

Ao longo dos ciclos de vida, o sistema imunológico é menos eficaz nos extremos da idade (SIMON *et al.*, 2015; MÜLLER; PAWELEC, 2016), variação que está diretamente associada à imaturidade fenotípica observada no período pós-natal imediato (BASHA *et al.*, 2014; TSAFARAS *et al.*, 2020) e à deterioração celular e molecular na senescência (SIMON *et al.*, 2015; BARBÉ-TUANA *et al.*, 2020).

Com o evoluir do envelhecimento, esse declínio da atividade do sistema imunológico, caracterizado como imunossenescência, manifesta-se em redução gradual na variabilidade fenotípica morfofuncional e diminuição de respostas celulares e humorais inatas e adaptativas a novos antígenos (SIMON *et al.*, 2015; BARBÉ-TUANA *et al.*, 2020).

Como esperado, esse processo está diretamente envolvido no aumento da propensão de organismos idosos a doenças infecciosas, os quais frequentemente desenvolvem manifestações clínicas atípicas, são menos responsivos ao tratamento, e exibem taxas de gravidade e mortalidade mais altas (GINALDI *et al.*, 2001; GAVAZZI; KRAUSE, 2002; SANTORO *et al.*, 2021).

Embora estudos anteriores demonstrem o aumento da sensibilidade de organismos idosos a infecções por fungos, bactérias e vírus (HOF, 2010; OH *et al.*, 2019; CHEBIB *et al.*, 2021), a relação entre envelhecimento, imunossenescência e doenças parasitárias ainda é mal entendida. Nesse sentido, as limitadas evidências disponíveis sugerem que a imunossenescência está associada à diminuição da diversidade e amplitude dos mecanismos de defesa contra parasitas helmintos (ABDOLI; ARDAKANI, 2020) e protozoários (ADAM *et al.*, 2003; FELIZARDO *et al.*, 2018a, 2018b). Consequentemente, a maior vulnerabilidade ao parasitismo parece estar ligada à diminuição do reconhecimento do antígeno, redução da ativação de leucócitos e desequilíbrio na polarização dos fenótipos imunológicos Th1 e Th2 (ADAM *et al.*, 2003; FELIZARDO *et al.*, 2018a, 2018b) que modulam a resistência e suscetibilidade do hospedeiro a infecções sistêmicas como a malária (PEREZ-MAZLIAH; LANGHORNE, 2015), leishmaniose (NYLÉN; GAUTAM, 2010), e doença de Chagas (FELIZARDO *et al.*, 2018b; CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021).

Considerando que a resposta imune é a principal linha de defesa contra doenças infecciosas (BEN-YEHUDA; WEKSLER, 1992; TAYLOR *et al.*, 2015), estratégias que reduzam os mecanismos de deterioração celular e humoral associados à imunossenescência podem se tornar relevantes no sentido de aumentar a resistência do hospedeiro a doenças parasitárias. Como o tratamento etiológico das infecções parasitárias é a atual lógica médica dominante, tratar o hospedeiro sem focar diretamente no patógeno representa uma mudança de paradigma estimulante e desafiadora a ser almejada. Nesse sentido, estudos anteriores relataram que a rapamicina, substância inibidora da via m-TOR, pode prolongar a expectativa de vida e atrasar o início dos distúrbios relacionados com a idade em várias espécies animais, incluindo a imunossenescência em mamíferos (MANNICK *et al.*, 2014; WALTERS; COX, 2018). Assim, a evidência de que rapálogos também podem reverter o declínio imunológico relacionado à idade em ratos e humanos e prevenir doenças relacionadas ao envelhecimento (CHEN *et al.*, 2009; MANNICK *et al.*, 2018) levanta uma perspectiva terapêutica excitante que permanece inexplorada, visando ao aumento da resistência do hospedeiro idoso a infecções parasitárias.

Estudos anteriores identificaram que a via m-TOR do hospedeiro está envolvida na replicação, crescimento e diferenciação do tripanossoma (RASHIDI *et al.*, 2021), bem como no desequilíbrio molecular em cardiomiócitos infectados com *Trypanosoma cruzi* (LIBISCH *et al.*, 2018). Além disso, a rapamicina provou ser eficaz em desencadear a ativação do inflamassoma e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) *in vitro*, estimulando a diferenciação de um macrófago de fenótipo prejudicial à replicação do *T. cruzi* (ROJAS MÁRQUEZ *et al.*, 2018). *In vivo*, a rapamicina também melhora a resposta de linfócitos T CD8⁺ efetores e de memória, induzidos por imunização com antígenos de *T. cruzi*, determinando 100% de sobrevivência celular em comparação com 42% em animais não tratados com a substância (MORASCHI *et al.*, 2021). Apesar de não possuir impacto antiparasitário direto e evidente, efeitos anti-inflamatórios e cardioprotetores foram identificados em animais infectados com *T. cruzi* que receberam rapamicina, sugerindo uma potencial relevância deste medicamento no manejo da cardiomiopatia chagásica aguda (DUQUE *et al.*, 2020).

Particularmente, a evidência *in vivo* utilizando modelos experimentais de infecção parasitária é limitada e baseada na administração da rapamicina concomitante com a infecção com *T. cruzi* (DUQUE *et al.*, 2020). Assim, o impacto

desta droga na atenuação da imunossenescência e no equilíbrio entre resistência e suscetibilidade a infecções parasitárias, incluindo a doença de Chagas, permanece desconhecido.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo da nossa pesquisa é avaliar o desenvolvimento da infecção com *T. cruzi* e a miocardite aguda em animais suscetíveis à infecção.

2.1 Objetivo Geral

Comparar o desenvolvimento da infecção com *T. cruzi* e a miocardite aguda em camundongos jovens infectados em relação a camundongos idosos infectados não tratados e cronicamente pré-tratados com rapamicina, modelo que utilizamos na nossa pesquisa e que difere de outros modelos pelo tratamento prévio à infecção.

2.2 Objetivos Específicos

Seleção e análise de alguns parâmetros que representam o parasitismo, a lesão miocárdica e os elementos do sistema de defesa do hospedeiro:

- a) nível de parasitismo no sangue e a carga parasitária cardíaca;
- b) imunoenensaio de citocinas (IL, IFN- e TNF) para avaliar a imunidade celular;
- c) imunoenensaio de anticorpos (IgG) para avaliar a imunidade humoral;
- d) análise histopatológica da microestrutura do coração;
- e) ensaio de mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glucosaminidase para avaliação do influxo de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, nos cardiomiócitos;
- f) imunoenensaio do peptídeo natriurético atrial (ANP), da expressão gênica da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e da arginase-1, do óxido nítrico (NO) e da atividade da arginase (ARG) para avaliar o grau de lesão miocárdica na doença de Chagas.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e aprovação ética

Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BL/6, pesando $28,05 \pm 3,77$ g, aleatoriamente divididos em 5 grupos com 8 animais em cada um:

Grupo **YU**: camundongo jovem não infectado;

Grupo **YI**: camundongo jovem infectado;

Grupo **AU**: camundongo idoso não infectado;

Grupo **AI**: camundongo idoso infectado não tratado;

Grupo **AIT**: camundongo idoso infectado tratado com rapamicina.

Camundongos idosos com 96 semanas de idade (HAGAN, 2017) e jovens com 8 semanas (ROGGERO *et al.*, 2002; HAGAN, 2017) foram mantidos em condições de umidade (55 a 65%) e temperatura ($21^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C) controladas e ciclos claro / escuro de 12h / 12h. Ração comercial para roedores e água foram fornecidos à vontade. O Comitê de Ética Institucional para Animais de Experimentação da UNIFAL-MG aprovou o estudo (protocolo 48/2017).

3.2 Tratamento com rapamicina

A rapamicina (Pfizer Inc., New York, NY, EUA) foi reconstituída na dose de 4 mg / ml em etanol e, em seguida, diluída em 5% PEG-400 / Tween-80 (*w / v*) (Merk & Co., Kenilworth, NJ, EUA). Os camundongos tratados (grupo AIT) receberam a dose de 8 mg / kg / semana, dividida em duas injeções intraperitoneais de 4 mg / kg com intervalo de 3 dias na semana. A dose de 4 mg / kg rapamicina foi selecionada devido à sua eficácia em restaurar a função imunológica e aumentar a resistência à infecção pelo vírus da influenza em camundongos idosos (CHEN *et al.*, 2009). O tratamento foi administrado da 8^a à 96^a semana de idade nos animais idosos do grupo AIT.

3.3 Infecção com *T. cruzi*

Para garantir a eliminação completa da rapamicina do organismo do hospedeiro (ARRIOLA APELO *et al.*, 2016) e evitar o efeito direto do medicamento na infecção (DUQUE *et al.*, 2020), os animais idosos tratados (grupo AIT) foram infectados com

T. cruzi somente 7 dias após a administração da última dose do medicamento. Neste momento, animais jovens (grupo YI) e idosos não tratados (grupo AI) foram simultaneamente infectados. Todos os animais infectados foram inoculados intraperitonealmente com uma dose única de 5.000 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y virulenta de *T. cruzi*, e a infecção foi acompanhada durante 16 dias (FELIZARDO *et al.*, 2018b). Este período foi adotado considerando aspectos éticos, evitando-se a fraqueza excessiva e a deliberada letalidade do animal devidas ao agravamento amplamente reconhecido da infecção em camundongos (OLFERT; GODSON, 2000). Após 24 h, os animais, sob anestesia (150 mg / kg de cetamina e 16 mg / kg de xilazina), foram sacrificados por punção cardíaca (MENDONÇA *et al.*, 2020a). O sangue periférico e o coração foram coletados e usados para análises molecular, imunológica, bioquímica e microestrutural (NOVAES *et al.*, 2018).

3.4. Parasitismo no sangue

O parasitismo sanguíneo foi avaliado diariamente até 16 dias após a inoculação do *T. cruzi*, período em que a parasitemia é patente (FELIZARDO *et al.*, 2018b; DUQUE *et al.*, 2020). O número de tripomastigotas circulantes foi quantificado usando o método morfológico clássico e direto (BRENER, 1962), o qual consiste, resumidamente, na retirada de amostras de sangue periférico de 5 µl, coletadas da veia da cauda do camundongo, mecanicamente distendidas em lâminas de vidro histológicas e observadas em microscópio convencional de campo claro (Axioscope A1, Carl Zeiss, Jena, Alemanha). A distribuição volumétrica de tripomastigotas foi calculada pelo número de parasitas contados em 50 campos microscópicos não coincidentes, visualizados com aumento de 400 X (NOVAES *et al.*, 2018). A curva de parasitemia de todos os grupos infectados foi registrada diariamente durante todo o período de infecção e parâmetros como o período pré-patente, parasitemia média, pico de parasitemia e o tempo da queda da parasitemia foram calculados. Animais de controle (grupos YU e AU) foram submetidos aos mesmos procedimentos para simular o estresse experimental e confirmar a ausência de infecção (FELIZARDO *et al.*, 2018b).

3.5 Carga parasitária cardíaca

O método baseado na PCR de transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi usado para determinar a carga parasitária a partir da quantificação do DNA do *T. cruzi* em amostras de miocárdio (MENDONÇA *et al.*, 2020a). Nesta técnica, o DNA genômico foi extraído das amostras usando um kit comercial de purificação de DNA (Promega, São Paulo, SP, Brasil), seguindo um protocolo validado (CALDAS *et al.*, 2012). A pureza e integridade do DNA foram analisadas por espectrofotometria (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e a concentração de DNA foi ajustada para 25 ng / µl. Todas as reações foram padronizadas para um volume de 10 µl, contendo 50 ng de DNA genômico, 5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) e 0,35 µM de iniciadores de DNA de *T. cruzi* ou 0,5 µM de iniciadores de TNF murino.

O ensaio molecular foi desenvolvido seguindo condições analíticas (tempo, temperatura e ciclos) descritas e validadas (SANTOS *et al.*, 2015). Uma curva padrão foi obtida para microplacas reativas de poliestireno com 96 poços, e cada placa apresentou dois controles negativos com iniciadores *T. cruzi*-específicos ou camundongo-específicos sem DNA e com DNA de tecido de animais não infectados.

Os valores médios quantificados para o DNA do *T. cruzi* foram normalizados como segue:

$$\text{Valor normalizado} = \frac{\text{DNA médio de } T. \text{ cruzi}}{\text{DNA médio de TNF}} \times 1000$$

onde 1000 corresponde à concentração esperada de TNF em amostras de coração com 30 mg.

3.6 Imunoensaio de imunoglobulinas anti-*T. cruzi*

Amostras de sangue contendo 400 µl, coletadas da veia da cauda dos camundongos, foram tratadas com 5 µl de heparina, centrifugadas por 15 min a 12.000 g, e o plasma coletado para imunoensaio de imunoglobulinas e citocinas. Os anticorpos anti-*T. cruzi* foram quantificados por imunoabsorção enzimática (ELISA)

(GONÇALVES-SANTOS *et al.*, 2019). Para tal, microplacas reativas de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas com antígenos totais de *T. cruzi* (cepa Y), obtidos por extração alcalina, e incubados com o plasma de cada animal. Anticorpos anti-camundongo conjugados com peroxidase anti-imunoglobulina G total (IgG), anti-IgG1, IgG2a e IgG2b foram aplicados nos poços pré-sensibilizados (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, EUA). Após tratamento com o substrato O-fenilenodiamina, a reação foi interrompida com 100 µl de HCl (2 mol / L) e a densidade óptica foi lida por espectrofotometria a 490 nm (Anthos Zenyth 200, Biochrom, Cambridge, Reino Unido).

3.7 Imunoensaio de citocinas

Os níveis plasmáticos de citocinas foram analisados em citômetro de fluxo FACSVerse usando um kit de matriz citométrica específico para camundongos e seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As citocinas interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-17 (IL-17), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon-gama (IFN-γ) foram medidas. Curvas padrão foram montadas para todas as citocinas, em concentrações variando de 20 a 5000 pg / ml. Amostras de plasma de camundongos não infectados foram usadas como controle negativo (MENDONÇA *et al.*, 2020a).

3.8 Análise microestrutural do coração

Fragmentos de coração foram fixados em formalina a 10% (pH = 7,2 / 0,1 M) por 18 h, embebidos em metacrilato de glicol e seccionados em fatias de 3 µm de espessura usando um micrótomo rotativo com facas de vidro (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Duas lâminas histológicas com seis seções de coração em cada uma foram obtidas para cada animal. Um protocolo foi adotado para evitar a análise da mesma área histológica (MENDONÇA *et al.*, 2020), no qual 1 em cada 30 seções foram coletadas e utilizadas na análise morfológica. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina a 60° C e montados com Entellan (Merck Millipore, Kenilworth, NJ, EUA). Para cada seção histológica, cinco campos histológicos aleatórios não coincidentes foram examinados em microscópio convencional de campo claro com

aumento de 400 X (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemanha) (SOUZA-SILVA *et al.*, 2020), com um total de 60 campos histológicos aleatórios submetidos à análise.

A análise histopatológica foi feita pela comparação das características microscópicas do miocárdio entre animais controle e infectados, considerando os seguintes aspectos (NOVAES *et al.*, 2016):

- (i) infiltrado inflamatório;
- (ii) distribuição e organização do parênquima e estroma do coração;
- (iii) morfologia e distribuição de cardiomiócitos, vasos sanguíneos e células intersticiais;
- (iv) presença de cardiomiólise e mionecrose;
- (v) fibrose do tecido;
- (vi) distribuição de ninhos de *T. cruzi*.

A miocardite foi abordada quantitativamente usando princípios estereológicos (NOVAES *et al.*, 2013). Deste modo, a celularidade do tecido por área histológica examinada (QAinc) foi determinada pela seguinte fórmula:

$$QAinc = \frac{\Sigma_{int}}{At}$$

onde Σ_{int} é o somatório do número de núcleos de células intersticiais / inflamatórias, e At é a dimensão da área-teste ($25 \times 10^3 \mu m^2$).

A extensão da remodelação microestrutural do parênquima e estroma do coração foi avaliada determinando-se a densidade de volume (V_v %) ocupada por cardiomiócitos (V) e tecido conectivo (v) (NOVAES *et al.*, 2013). Esses parâmetros foram estimados por contagem de pontos de acordo com a fórmula estereológica:

$$V_v = \frac{\Sigma P}{\Sigma P_T}$$

onde ΣP é o somatório do número de pontos que atingiu a estrutura de interesse (cardiomiócitos ou tecido conjuntivo) e ΣP_T é o número de pontos testados. Um sistema-padrão de teste com 42 pontos equidistantes delimitados numa área-teste de $1,38 \times 10^4 \mu m^2$ foi usado. Todas as análises estereológicas foram realizadas por meio

do software de análise de imagem Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) (RODRIGUES *et al.*, 2017).

3.9 Ensaio de N-acetil- β -D-glucosaminidase e mieloperoxidase

O influxo cardíaco de macrófagos foi avaliado a partir da atividade da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) (MENDONÇA *et al.*, 2020a), enzima lisossômica que se encontra aumentada em monócitos / macrófagos ativados e recrutados para áreas inflamadas (GUEDES-DA-SILVA *et al.*, 2015). A atividade desta enzima foi medida em preparado homogeneizado de coração a partir de um kit colorimétrico comercial de acordo com as instruções do fabricante (Abcam, Cambridge, UK). Este ensaio usou um derivado sintético de p-nitrofenol (R-pNP) como substrato da enzima, que libera pNP, que foi medido por espectrofotometria a 400 nm (Anthos Zenyth 200, Biochrom, Cambridge, Reino Unido).

O influxo cardíaco de neutrófilos foi estimado pela quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) (MENDONÇA *et al.*, 2020a; GUEDES-DA-SILVA *et al.*, 2015). Os sedimentos, após a retirada do plasma para o imunensaio de citocinas, imunoglobulinas e ANP, foram pesados, homogeneizados em tampão de pH 4,7 (0,02 M Na₃PO₄, 0,015 M Na₂-EDTA e NaCl 0,1 M) e centrifugados a 12.000 g, a 4° C por 10 minutos; foram então suspensos em solução de hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio brometo a 0,5%, preparada em tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 5,4) e esta mistura foi tratada com uma solução de reagente contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3 mM, preparada em tampão de fosfato de sódio (pH 6,0), e 1,6 mM de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO). A atividade da mieloperoxidase foi medida por espectrofotometria a 400 nm (Anthos Zenyth 200, Biochrom, Cambridge, UK).

3.10 imunensaio do peptídeo natriurético atrial

O peptídeo natriurético atrial murino (ANP) foi quantificado usando um kit ELISA comercial seguindo as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) (JIANG *et al.*, 2019). As mesmas amostras de plasma usadas para quantificar citocinas e imunoglobulinas foram usadas para medir os níveis circulantes de ANP. As densidades ópticas das reações foram medidas por espectrofotometria a 450 nm

(Anthos Zenyth 200; Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os resultados de ANP foram calculados a partir de uma curva padrão baseada em proteína recombinante, variando de 0,1-1000 pg / ml.

3.11 Expressão da óxido nítrico-sintase induzida e da arginase-1

A expressão dos genes da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e da Arginase-1 foi determinada em amostras de miocárdio pela reação quantitativa da cadeia da polimerase (qPCR) (FELIZARDO *et al.*, 2018b). O DNA complementar foi obtido a partir de mRNA usando um kit molecular de transcrição reversa de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EUA). Iniciadores validados para os genes da iNOS e da Arginase-1 foram usados (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EUA). A expressão da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usada como controle endógeno. Os resultados da expressão genômica de iNOS e ARG-1 foram padronizados pela expressão de GAPDH.

3.12 Ensaio de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico (NO) nos tecidos foram estimados a partir da quantificação da relação nitrito / nitrato ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) em preparado homogeneizado de coração (MENDONÇA *et al.*, 2020a). Para isso, um kit bioquímico comercial foi usado de acordo com as instruções do fabricante (EMNSO, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Este ensaio colorimétrico foi baseado na reação de Griess, que usa a enzima nitrato-redutase para catalisar a reação que converte nitrato em nitrito, na qual o nitrito é detectado como um metabólito nitrogenado colorido produzido a partir da reação. A densidade óptica foi lida por espectrofotometria a 540 nm (Anthos Zenyth 200; Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Os valores de detecção variaram de 0 a 100 μM , e a sensibilidade do ensaio foi de 0,222 μM para o nitrito e de 0,625 μM para o nitrato.

3.13 Ensaio da atividade da arginase

A atividade da arginase (ARG) cardíaca foi medida conforme relatado anteriormente (RODRIGUES *et al.*, 2017). Amostras de coração foram

homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH = 7,5), tratadas com Triton X-100 0,1%, agitadas em vórtice por 10 min e centrifugadas a 3000 g. A atividade da ARG foi medida seguindo um protocolo bioquímico (MUNDER *et al.*, 1998; HESSE *et al.*, 2001). Resumidamente, sua atividade foi iniciada por aquecimento de amostras de preparado homogeneizado de coração dissolvidas em 10 mM MnCl₂ a 56° C por 10 min. A clivagem da arginina foi monitorada por 15-120 min a 37° C e pH = 9,7 após a adição de 0,05 M de L-arginina à mistura do homogeneizado. A reação foi interrompida por uma solução contendo H₂O / H₃PO₄ / H₂SO₄ (7/3/1, v / v / v). A atividade da arginase (ARG) foi estimada considerando a formação de 1 mM de ureia por min, medida por espectrofotometria a 540 nm, após a adição de 4 mL de α-isonitrosopropiofenona e aquecimento a 95° C por 30 min (RODRIGUES *et al.*, 2017).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os avaliadores foram cegos para a coleta e análise de dados. Os resultados foram relatados como valores relativos (%), média e desvio padrão (S.D.) ou mediana e intervalo interquartil. A distribuição de dados foi verificada pelo teste de D'Agostino-Pearson.

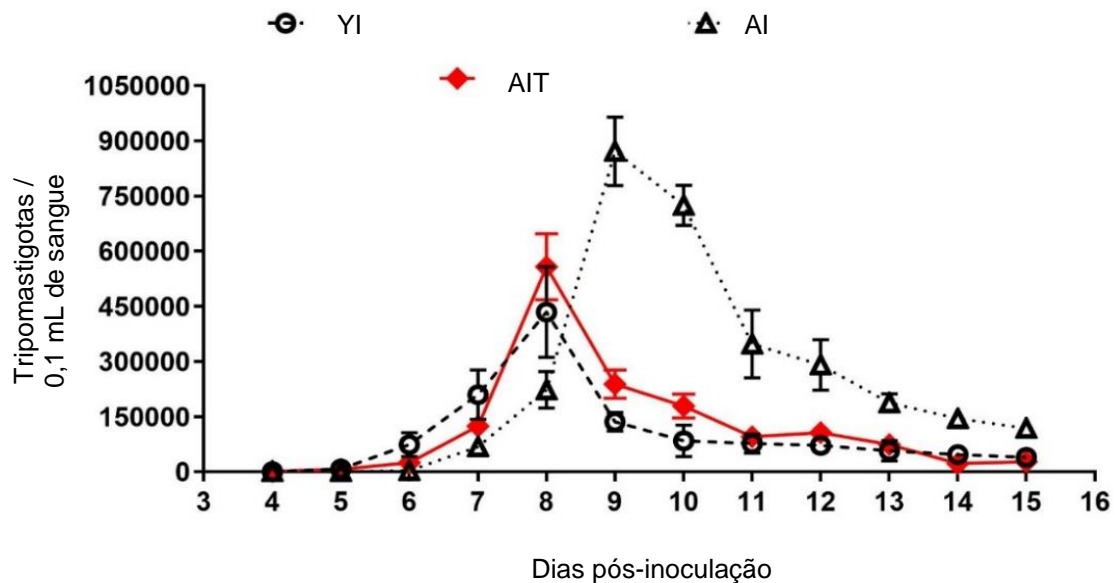
Os dados paramétricos foram comparados entre grupos pela análise de variância unilateral (unilateral ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Student Newman-Keuls para múltiplas comparações.

Os dados não paramétricos foram comparados pelo teste de postos de Kruskal-Wallis (análise unilateral de variância de um fator em postos) seguido pelo teste Student Newman-Keuls. Todas as comparações com valor $P \leq 0,05$ (nível de confiança de 95%) foram consideradas estatisticamente significativas.

5 RESULTADOS

A infecção foi confirmada microscopicamente em todos os animais 5 dias pós-inoculação e todos os grupos infectados apresentaram um período pré-patente semelhante (4 dias). Camundongos jovens (YI) e idosos infectados tratados com rapamicina (AIT) exibiram um pico de parasitemia semelhante (8º dia), que se mostrou retardado em animais idosos infectados não tratados (AI) (9º dia), sendo que a eliminação do parasita foi mais lenta neste grupo. Nenhum grupo mostrou eliminação parasitológica completa durante o período do experimento (Figura 1).

Figura 1 – Curva de parasitemia.



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: YI camundongos jovens infectados com *T. cruzi* não tratados;
AI camundongos idosos infectados com *T. cruzi* não tratados;
AIT camundongos cronicamente pré-tratados com rapamicina.

Os resultados da área sob a curva de parasitemia ou parasitemia total (AUC), a parasitemia média e o pico de parasitemia foram semelhantes em camundongos jovens infectados (YI) em comparação com animais idosos infectados tratados com rapamicina (AIT) ($P > 0,05$). Esses parâmetros foram maiores nestes dois grupos em comparação com o grupo de animais idosos infectados não tratados (AI) ($P \leq 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados de parasitemia.

Grupo	AUC $\times 10^4$	Parasitemia média (Tryp. $\times 10^2$ / 0,1 mL sangue)	Pico de parasitemia (Tryp. $\times 10^2$ / 0,1 mL sangue)
YI	128.74 \pm 34.84*	897.40 \pm 247.43*	4340.00 \pm 1234.63*
AI	338.99 \pm 38.34	1967.24 \pm 144.44	8710.00 \pm 929.18
AIT	159.14 \pm 24.87*	1072.23 \pm 87.88*	5575.00 \pm 898.74*

Fonte: da autora, 2021.

Legenda: AUC: área sob a curva de parasitemia;

Tryp.: tripomastigotas;

YI camundongo jovem não tratado infectado;

AI camundongo idoso não tratado infectado;

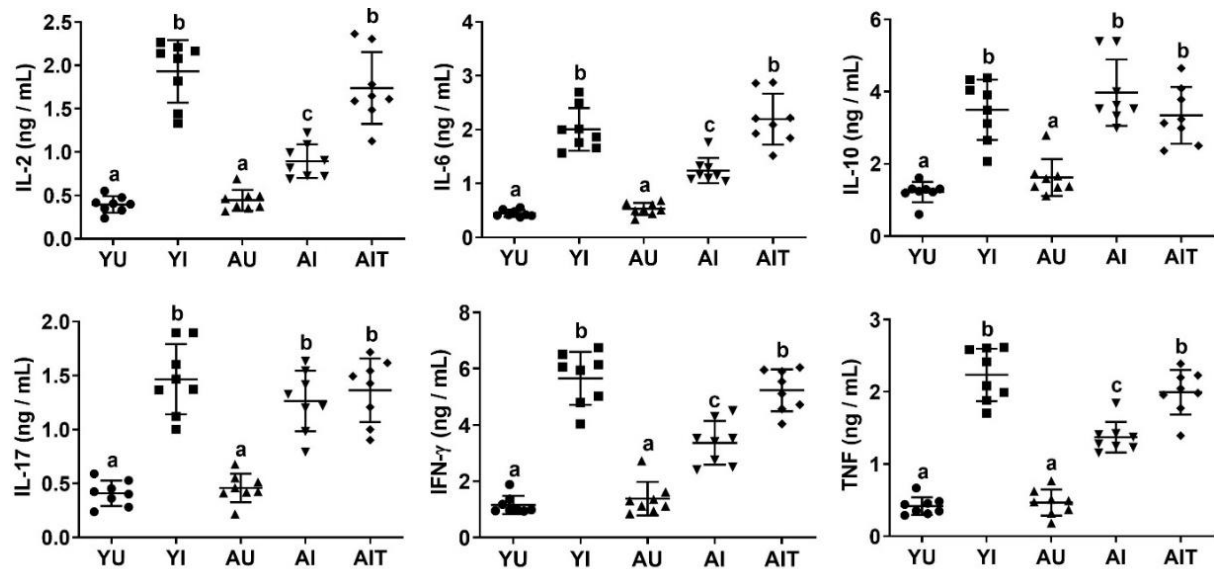
AIT camundongo idoso infectado tratado com rapamicina;

Dados expressos em média \pm erro padrão;

*Diferença estatística significativa em relação ao grupo AI ($P \leq 0,05$).

Todos os grupos infectados (YI, AI e AIT) exibiram níveis plasmáticos aumentados de todas as citocinas investigadas em comparação com animais jovens e idosos não infectados (YU e AU) ($P \leq 0,05$). As citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF aumentaram de forma semelhante ($P > 0,05$) em animais jovens infectados e camundongos idosos infectados tratados com rapamicina em comparação com animais idosos infectados não tratados ($P \leq 0,05$). Os níveis plasmáticos de IL-10 e IL-17 foram semelhantes em todos os grupos infectados ($P > 0,05$) (Figura 2).

Figura 2 – Níveis plasmáticos de citocinas.



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: YU camundongo jovem não infectado;

YI camundongo jovem não tratado infectado;

AU camundongo idoso não infectado;

AI camundongo idoso não tratado infectado;

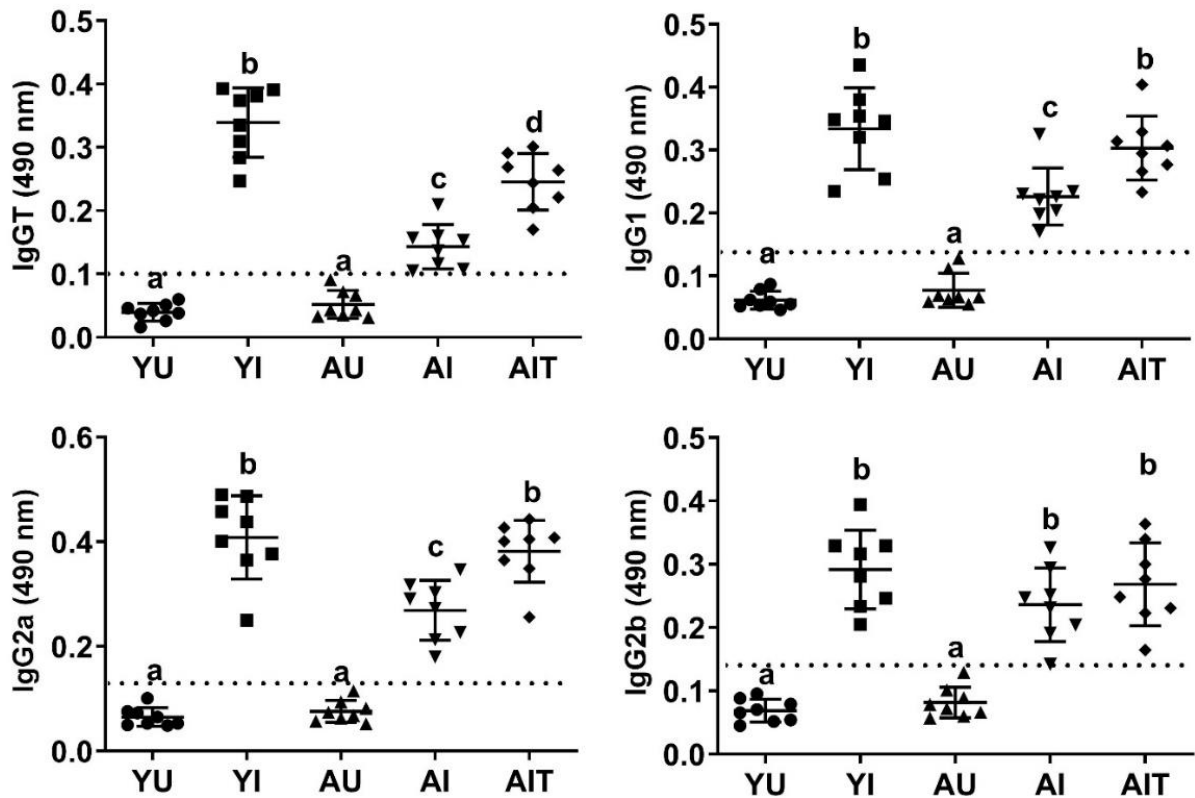
AIT camundongo idoso infectado tratado com rapamicina;

Dados expressos em média e desvio padrão;

Os pontos representam os valores individuais obtidos para cada animal;

a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$), e letras iguais são estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$).

Os títulos plasmáticos de IgG total, IgG1 e IgG2a aumentaram em todos os animais infectados (YI, AI e AIT) em comparação aos não infectados (YU e AU) ($P \leq 0,05$). O título plasmático de IgG total foi maior em camundongos idosos infectados tratados com rapamicina (AIT) em comparação com animais idosos infectados não tratados (AI) ($P \leq 0,05$), mas menor em comparação com camundongos jovens infectados não tratados (YI) ($P \leq 0,05$). Os títulos de IgG1 e IgG2a foram semelhantes em camundongos idosos infectados tratados com rapamicina e animais jovens infectados não tratados (AIT e YI) ($P > 0,05$), mas maiores em comparação com camundongos idosos infectados não tratados (AI) ($P \leq 0,05$). O título plasmático de IgG2b foi semelhante em todos os grupos infectados ($P > 0,05$) (Figura 3).

Figura 3 – Níveis plasmáticos de imunoglobulina anti-*T. cruzi*.

Fonte: da autora, 2021.

Legenda: YU camundongo jovem não infectado;

YI camundongo jovem não tratado infectado;

AU camundongo idoso não infectado;

AI camundongo idoso não tratado infectado;

AIT camundongo idoso infectado tratado com rapamicina;

Linha pontilhada: valor discriminante considerando o resultado médio de IgG para animais não infectados mais dois desvios padrão;

Dados expressos em média e desvio padrão;

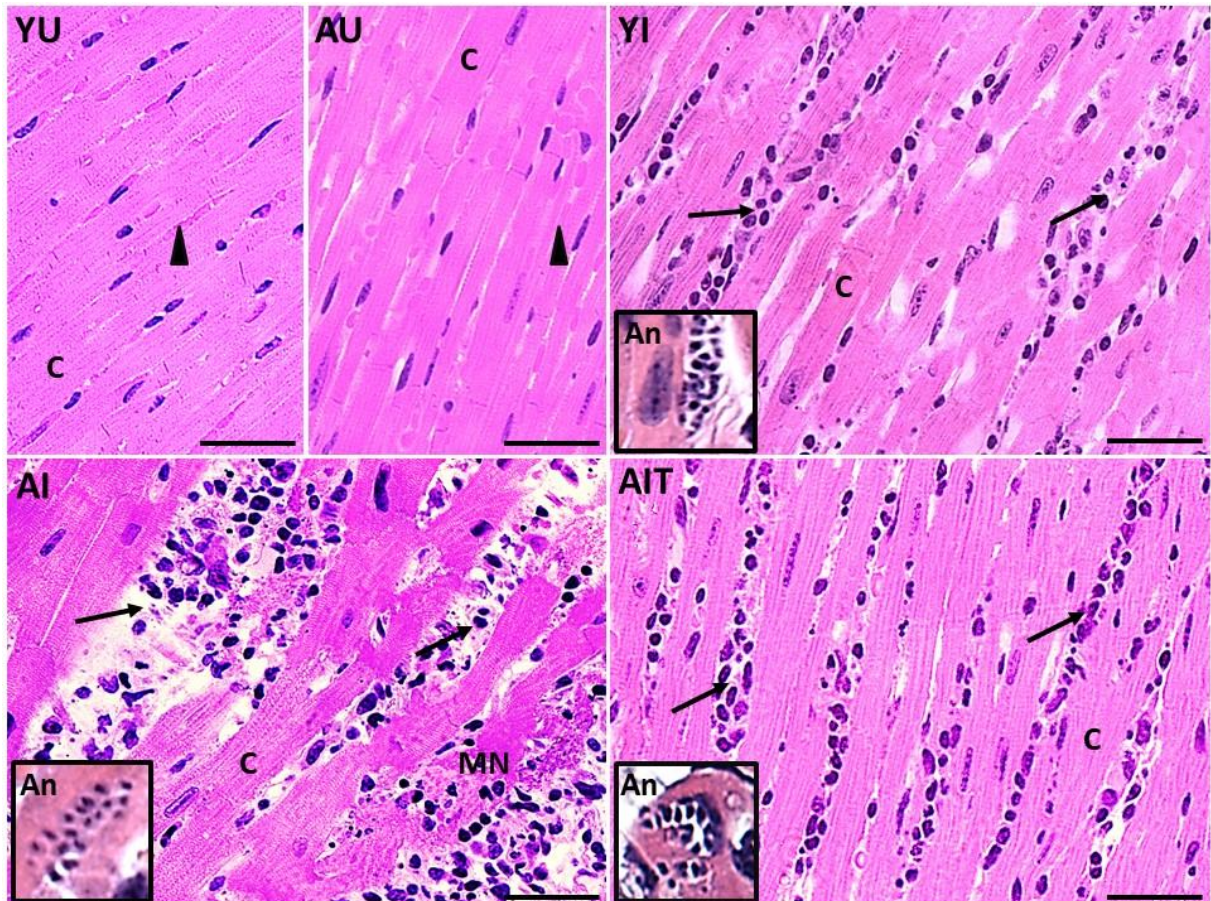
Pontos representam os valores individuais obtidos para cada animal;

a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$), e letras iguais são estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$).

Animais jovens e idosos não infectados (YU e AU) apresentaram microestrutura bem organizada do parênquima e estroma cardíaco, com cardiomiócitos paralelos, tecido conectivo escasso e discreta celularidade intersticial constituída principalmente por células mononucleares. Todos os animais infectados exibiram miocardite acentuada, expressa em celularidade intersticial intensa e ninhos evidentes de amastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos. Essas anormalidades histoarquiteturais foram semelhantes em animais jovens infectados (YI) e camundongos idosos infectados tratados com rapamicina (AIT). Por outro lado, animais idosos infectados não tratados (AI) exibiram um infiltrado inflamatório muito mais pronunciado, com

evidência morfológica de hipertrofia de cardiomiócitos e mionecrose, além de intensa proliferação do tecido conectivo (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografias do coração.



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: YI camundongo jovem não tratado infectado;

AI camundongo idoso não tratado infectado;

AIT camundongo idoso infectado tratado com rapamicina;

Coloração: hematoxilina e eosina em microscopia de campo claro;

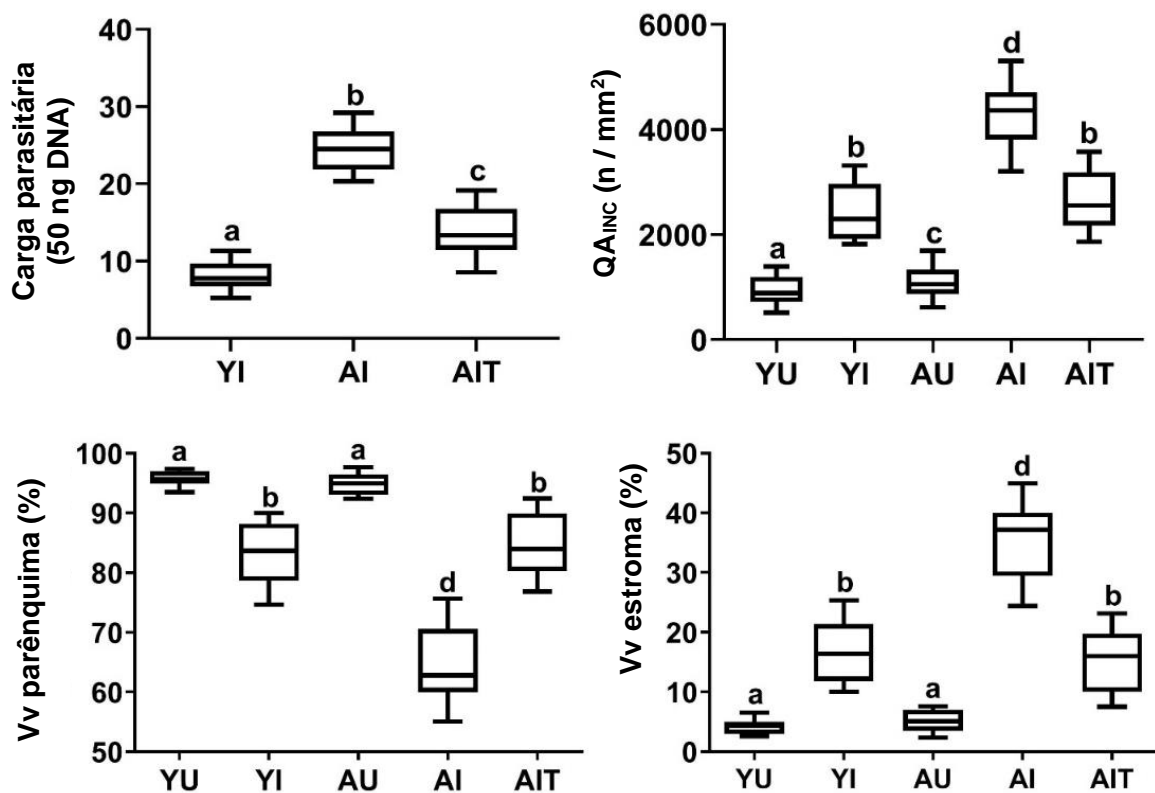
Barra de escala = 50 μ m;

Seta: infiltrado inflamatório; cabeça de seta: vaso sanguíneo; C: cardiomiócito; MN: mionecrose; Na: ninho de amastigotas de *T. cruzi*.

O DNA do parasita não foi detectado em amostras de coração de animais não infectados (YU e AU). Ambos os grupos de animais idosos infectados (AI e AIT) apresentaram carga parasitária maior do que o grupo de animais jovens infectados (YI) ($P \leq 0,05$). A carga parasitária foi menor em animais idosos infectados tratados com rapamicina (AIT) em comparação com animais idosos infectados não tratados (AI) ($P \leq 0,05$).

Corroborando a análise histopatológica, a celularidade intersticial, estroma cardíaco e distribuição do parênquima foram semelhantes em animais jovens e idosos não infectados (YU e AU) ($P \leq 0,05$). Todos os animais infectados exibiram um evidente infiltrado inflamatório, com maior celularidade intersticial em comparação com camundongos não infectados ($P \leq 0,05$). O infiltrado inflamatório, estroma cardíaco e distribuição do parênquima foram semelhantes em animais jovens infectados e animais idosos infectados tratados com rapamicina (YI e AIT) ($P > 0,05$), mas menores em comparação com camundongos idosos infectados não tratados (AI) ($P \leq 0,05$) (Figura 5).

Figura 5 – Carga parasitária e distribuição de volume (Vv) de células intersticiais/inflamatórias, parênquima e estroma no coração.



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: YU camundongo jovem não infectado;

YI camundongo jovem não tratado infectado;

AU camundongo idoso não infectado;

AI camundongo idoso não tratado infectado;

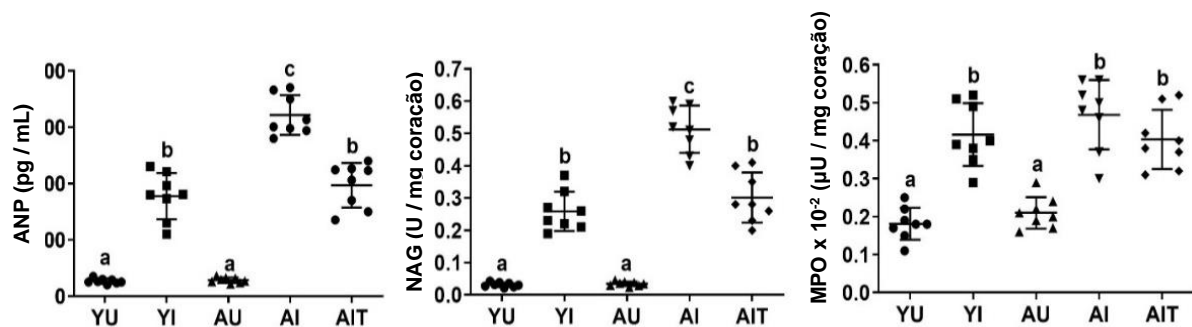
AIT camundongo idoso infectado tratado com rapamicina;

Dados expressos em mediana e intervalo interquartil;

a, b, c, d Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$), e letras iguais são estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$).

Os níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (ANP) e a atividade cardíaca da NAG e da MPO foram maiores em todos os grupos infectados em comparação com os grupos não infectados ($P \leq 0,05$). Os níveis plasmáticos do ANP e da NAG foram semelhantes em camundongos jovens infectados e animais idosos infectados tratados com rapamicina (YI e AIT) ($P > 0,05$), mas menores em comparação com animais idosos infectados não tratados (AI) ($P \leq 0,05$). A atividade da MPO foi semelhante em todos os grupos infectados ($P > 0,05$) (Figura 6).

Figura 6 – Níveis plasmáticos do peptídeo natriurético atrial (ANP) e a atividade cardíaca de N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO).



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: YU camundongo jovem não infectado;

YI camundongo jovem não tratado infectado;

AU camundongo idoso não infectado;

AI camundongo idoso não tratado infectado;

AIT camundongo idoso infectado tratado com rapamicina;

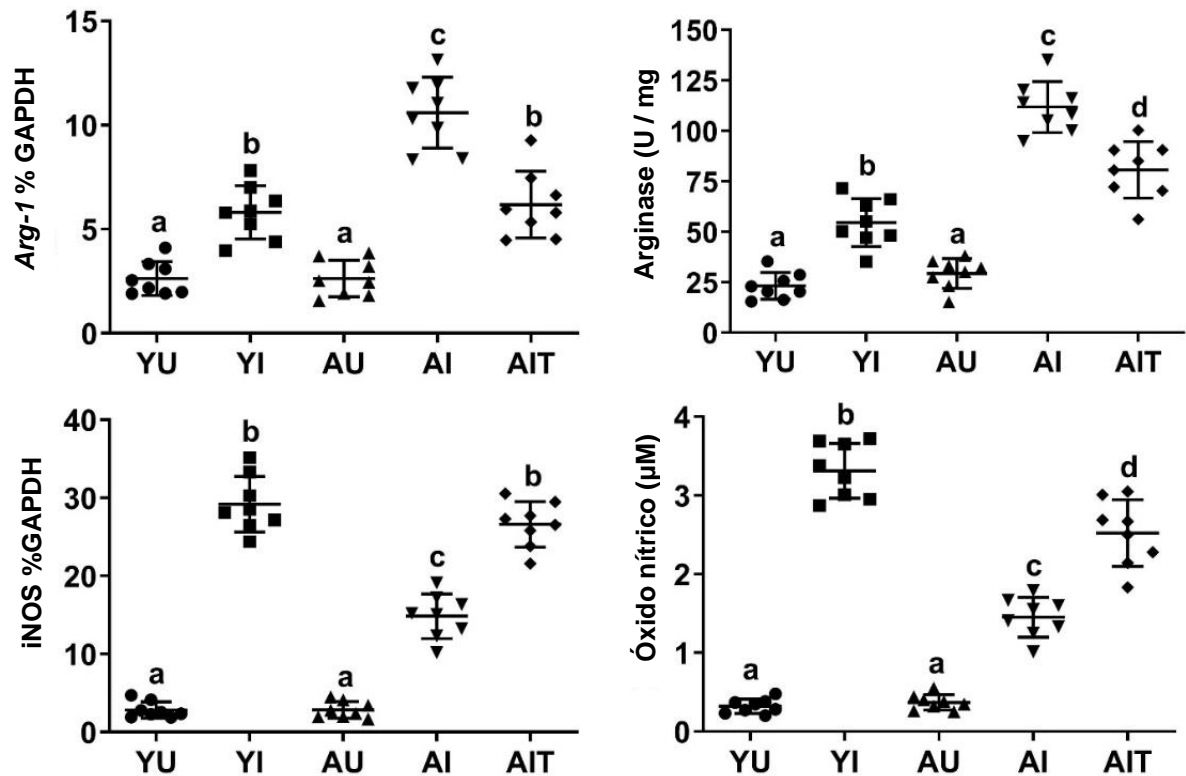
Dados expressos em média e desvio padrão;

Pontos representam os valores individuais obtidos para cada animal;

a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$), e letras iguais são estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$).

A expressão dos genes da Arginase-1 e da iNOS e os níveis de óxido nítrico (NO) e da atividade da arginase (ARG) foram maiores no coração de todos os animais infectados do que nos corações dos animais não infectados ($P \leq 0,05$). A expressão do gene da Arginase-1 e a atividade da arginase (ARG) foram maiores, mas a expressão da iNOS e os níveis de óxido nítrico (NO) foram menores em animais idosos infectados não tratados (AI) em comparação com animais jovens infectados e camundongos idosos infectados tratados com rapamicina (YI e AIT) ($P \leq 0,05$). A expressão dos genes da Arginase-1 e da iNOS foi semelhante em animais jovens infectados e camundongos idosos infectados tratados com rapamicina (YI e AIT) ($P \leq 0,05$) (Figura 7).

Figura 7 – Expressão dos genes da Arginase-1 (Arg-1) e da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), a atividade da arginase (ARG) e níveis de óxido nítrico (NO) no tecido cardíaco.



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: YU camundongo jovem não infectado;

YI camundongo jovem não tratado infectado;

AU camundongo idoso não infectado;

AI camundongo idoso não tratado infectado;

AIT camundongo idoso infectado tratado com rapamicina;

Dados expressos em média e desvio padrão;

Pontos representam os valores individuais obtidos para cada animal;

a, b, c, d Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$), e letras iguais são estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A partir de um modelo murino da doença de Chagas, comparamos a evolução da infecção por *T. cruzi* em animais jovens e camundongos idosos não tratados e tratados com a rapamicina, substância inibidora da via m-TOR. Conforme relatado em estudos anteriores (CARDILLO *et al.*, 1993; FELIZARDO *et al.*, 2018b), nossos achados reforçaram que animais idosos desenvolvem infecção mais grave, manifestando aumento da parasitemia, da carga parasitária, da inflamação cardíaca (miocardite) e sistêmica, da expressão dos genes da Arginase-1 e da iNOS, da atividade da arginase (ARG) e produção de óxido nítrico (NO), assim como menor produção de anticorpos anti-*T. cruzi*, em comparação com camundongos jovens. Por outro lado, todos esses parâmetros foram menores em animais idosos cronicamente tratados com rapamicina (AIT), nos quais a infecção e o dano microestrutural ao coração se aproximaram do perfil observado em animais jovens infectados.

Usando um modelo de doença validado (FELIZARDO *et al.*, 2018b), o parasitismo sanguíneo e cardíaco foi efetivamente detectado em todos grupos infectados. Esses achados indicaram que o inóculo de *T. cruzi* foi eficaz em induzir a doença de Chagas, condizente com as características do cepa Y, que é altamente infecciosa, virulenta, patogênica, imunogênica e adequada para modelo de cardiomiopatia infecciosa aguda (SOUZA-SILVA *et al.*, 2019; FELIZARDO *et al.*, 2018a, 2018b). Como a rapamicina não é um medicamento antiparasitário, esperava-se que o pré-tratamento com a droga não desencadeasse um efeito abortivo neste modelo de infecção por *T. cruzi*.

No entanto, ela exerceu um profundo impacto sobre o resultado parasitológico, imunológico e patológico de animais idosos infectados. Curiosamente, o pré-tratamento com rapamicina reduziu a amplitude da parasitemia ao antecipar a eliminação de tripomastigotas sanguíneos. Por outro lado, outro estudo indicou que o ciclo de vida do parasita não foi afetado em camundongos adultos tratados com rapamicina, mas neste estudo a rapamicina foi administrada concomitantemente com a infecção (DUQUE *et al.*, 2020), uma diferença marcante em relação ao nosso modelo experimental. Portanto, como o tratamento com a rapamicina foi interrompido 7 dias antes da infecção, nossos resultados estão potencialmente relacionados às propriedades de antienvelhecimento (MANNICK *et al.*, 2014; WALTERS; COX, 2018) e imunomoduladora (MANNICK *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2009) desta droga, que

parece ser capaz de retardar a deterioração das defesas antimicrobianas associada à imunossenescência e melhorar a resposta aos estímulos antigênicos (CHEN *et al.*, 2009; MORASCHI *et al.*, 2021).

Corroborando a atenuação da resposta imunológica na imunossenescência, o maior controle parasitológico foi consistente com a melhora do perfil imunológico (citocinas e anticorpos anti-*T. cruzi*) em animais idosos tratados com rapamicina (AIT), semelhante ao de animais jovens infectados (YI). Assim, animais idosos pré-tratados com rapamicina desenvolveram níveis mais elevados de citocinas Th1 do que os animais idosos não tratados. Na doença de Chagas, o desenvolvimento de um fenótipo Th1 bem polarizado é essencial para aumentar a resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*, melhorando o controle parasitológico enquanto ajusta a intensidade dos processos inflamatórios em órgãos-alvo (REED, 1988; MACHADO *et al.*, 2013; NOVAES *et al.*, 2016). A polarização Th1 é ativada pela IL-12, exercendo suas funções de defesa antiparasitária por meio de moléculas efetoras, como a IL-2, IFN- γ e TNF (SINIGAGLIA *et al.*, 1999; MACHADO *et al.*, 2013).

A IL-2 é produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺ ativados, que estimulam a ativação e diferenciação das células T CD8⁺ e NK em células efetoras com atividade citolítica (BACHMANN; OXENIUS, 2007). Na doença de Chagas, a IL-2 estimula a imunidade celular e humoral contra o *T. cruzi*, contribuindo para a redução da parasitemia e da mortalidade em camundongos infectados (CHOROMANSKI; KUHN, 1987; ACOSTA RODRIGUEZ *et al.*, 2007). Nesta doença, as células T CD4⁺ e T CD8⁺ exibem um fenótipo imunossenesciente, incluindo uma exaustão funcional da produção de IL-2 associada a um fenótipo de imunossupressão que determina infecções mais severas (CHOROMANSKI; KUHN, 1987; ALBAREDA *et al.*, 2009). Aparentemente, a diminuição de IL-2 pode ser induzida de forma independentemente por envelhecimento (PAHLAVANI; RICHARDSON, 1996) e pela infecção por *T. cruzi* (CHOROMANSKI e KUHN, 1987; ALBAREDA *et al.*, 2009), condições potencialmente ligadas ao agravamento da doença de Chagas em animais idosos. Assim, a rapamicina pode restringir o fenótipo de imunossupressão pela diminuição da deterioração na resposta de IL-2 em animais idosos, aumentando a resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*.

Além da IL-2, o IFN- γ e o TNF são efetores típicos Th1 muitas vezes diminuídos em animais idosos infectados com *T. cruzi* (RINK *et al.*, 1998; FELIZARDO *et al.*, 2018b). O IFN- γ e o TNF são essenciais para aumentar a resistência do hospedeiro

na doença de Chagas (MACHADO *et al.*, 2013; CRISTOVÃO-SILVA *et al.*, 2021). No entanto, perfis de expressão anormais dessas moléculas são detectados em animais idosos (RINK *et al.*, 1998; FELIZARDO *et al.*, 2018a, 2018b). O IFN- γ e o TNF têm efeitos antiparasitários pelo recrutamento de leucócitos para os órgãos parasitados, pelo estímulo da polarização do macrófagos clássicos e pela ativação do estresse oxidativo em células imunes (GUPTA *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2013). Neste último processo, o IFN- γ e o TNF desencadeiam a ativação da NADPH e a produção de ERO, como o O_2^- , OH^- , H_2O_2 e HClO, e espécies reativas de nitrogênio, como o ONOO $^-$ e NO (MARIAPPAN *et al.*, 2007; PRASANNA *et al.*, 2007), que desencadeiam processos de oxirredução que contribuem para neutralizar o *T. cruzi* (GUPTA *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2013).

A relevância do IFN- γ foi claramente comprovada em estudo clássico experimental com a doença de Chagas (REED, 1988), de forma que a administração desta citocina foi eficaz na prevenção de doenças agudas, imunossupressão e mortalidade em camundongos infectados com *T. cruzi*. Assim, medicamentos que melhoram a resposta do IFN- γ podem ser uma alternativa interessante para aumentar a resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi*, com potenciais implicações positivas com o tratamento pelo benznidazol, uma vez que este medicamento de referência interage com efetores Th1 (ou seja, IFN- γ e NO) para alcançar melhores efeitos tripanocidas (ROMANHA *et al.*, 2002).

Simultaneamente com o fenótipo Th1, identificamos níveis circulantes mais elevados de IL-6, mas não de IL-10 e IL-17, em animais idosos infectados e tratados com rapamicina em comparação com animais idosos infectados não tratados. A IL-6 é uma citocina Th2 envolvida na maturação de linfócitos B e na diferenciação de macrófagos (DIEHL; RINCÓN, 2002). Esta citocina inibe a diferenciação Th1 pelo aumento da expressão do gene SOCS-1, suprimindo a sinalização de IFN- γ (DIEHL e RINCÓN, 2002). Apesar de seu papel antagônico na polarização imunológica, a IL-6 é necessária para a resposta específica ao parasita e resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. Consequentemente, os animais “knockout” para a IL-6 exibem maior parasitemia e mortalidade mais precoce do que os animais selvagens, um processo potencialmente relacionado a defeitos na expressão vascular de VCAM-1 e ICAM-1 induzida pela IL-6 e na migração transendotelial de linfócitos para os órgãos infectados (GAO; PEREIRA, 2002). Como a IL-6, a IL-10 exerce um efeito antagônico na polarização Th1. Esta citocina é um típico efector T regulador (T reg) com potentes

efeitos anti-inflamatórios, incluindo a doença de Chagas (HUNTER *et al.*, 1997; ROFFÊ *et al.*, 2012). Embora não esteja implicada na redução da parasitemia e iniba a eliminação do *T. cruzi* dependente do IFN- γ , a IL-10 modula a intensidade da resposta do sistema imunológico, limitando a gravidade do dano inflamatório e oxidativo aos órgãos parasitados, especialmente o coração e, portanto, diminuindo a mortalidade dos hospedeiros infectados (ROFFÊ *et al.*, 2012). As IL-10 e IL-17 manifestaram um comportamento semelhante, ativando uma via que complementa a modulação Th1 e contribuindo para aumentar a resistência do hospedeiro (AMEZCUA VESELY *et al.*, 2020). Curiosamente, o aumento da produção de IL-17 em animais idosos infectados com *T. cruzi* foi identificado em estudo anterior (FELIZARDO *et al.*, 2018b), uma descoberta potencialmente relacionada ao uso de animais ainda mais idosos nesse estudo. A IL-17 é liberada principalmente por células T CD4⁺, exercendo atividade antiparasitária contra o *T. cruzi* e efeitos cardíacos protetores por estimular a imunidade das células T CD8⁺, o recrutamento de neutrófilos produtores de IL-10 supressora, e a atividade tripanocida de macrófagos mediada pelo aumento de NO (AMEZCUA VESELY *et al.*, 2020). Evidências anteriores indicaram que o bloqueio da IL-17 aumenta o recrutamento de leucócitos, a gravidade da miocardite e as taxas de mortalidade em camundongos infectados com *T. cruzi*, apesar de um reduzido parasitismo orgânico (DA MATTA GUEDES *et al.*, 2010). Surpreendentemente, a biossíntese de IL-10 e IL-17 não foi regulada negativamente em animais idosos não tratados e tratados com rapamicina, proporcionando um sinal contra-regulador necessário para reduzir a hiperativação imunológica induzida por efetores Th1 (AMEZCUA VESELY *et al.*, 2020). No entanto, o aumento na produção de IL-6 e a manutenção das respostas das IL-10 e IL-17 não foram suficientes para conter o parasitismo e o dano inflamatório nos corações de animais idosos não tratados. Por outro lado, animais pré-tratados com rapamicina apresentaram melhor controle parasitológico e da inflamação, indicando que o efeito desta droga na restauração da produção de efetores Th1 pode ser essencial para limitar a infecção por *T. cruzi* e a miocardite aguda em animais idosos.

Em sinergia com a imunidade celular, a resposta humoral é essencial para limitar a propagação, sobrevivência e gravidade da infecção pelo *T. cruzi* (TAKEHARA; MOTA, 1991; ACOSTA RODRIGUEZ *et al.*, 2007; BRYAN *et al.*, 2010). Como esperado, títulos aumentados de anticorpos anti-*T. cruzi* foram detectados em todos os grupos infectados. No entanto, animais idosos exibiram uma acentuada

diminuição na produção de IgG total, IgG1 e IgG2a em comparação com animais jovens, indicando um fenótipo humoral prejudicial ao hospedeiro e favorável à progressão da doença de Chagas (TAKEHARA; MOTA, 1991; ACOSTA RODRIGUEZ *et al.*, 2007; BRYAN *et al.*, 2010). Esta proposição é reforçada pela maior parasitemia, carga parasitária e miocardite em animais idosos, resultados potencialmente ligados à ativação tardia da resposta imunológica adaptativa, bem como à redução da expressão de citocinas, migração de linfócitos, expansão clonal e produção de anticorpos observada na imunossenescência (GINALDI *et al.*, 2001; FELIZARDO *et al.*, 2018a). Curiosamente, o pré-tratamento com a rapamicina reverteu parcialmente esta resposta humoral diminuída, mantendo uma produção equilibrada de IgG1 e IgG2a em camundongos idosos. A eficácia da resposta humoral foi demonstrada em camundongos com doença de Chagas, que apresentaram melhor controle parasitológico após imunização passiva com IgG anti-*T. cruzi* (BRYAN *et al.*, 2010). Entre as imunoglobulinas produzidas na doença de Chagas, as subclasses de IgG são as principais determinantes da proteção humoral contra o *T. cruzi*, principalmente devido a suas atividades líticas mediadas pela fixação do complemento (BRODSKYN *et al.*, 1988; TAKEHARA; MOTA, 1991). Nesse sentido, a IgG1 e especialmente a IgG2a têm efeitos neutralizantes mais potentes, promovendo uma melhor eliminação de parasitas e diminuição da parasitemia em infecções agudas (BRYAN *et al.*, 2010; PYRRHO *et al.*, 1998). No entanto, este efeito depende da polarização do fenótipo Th1, pois uma explosão precoce de citocina Th1 enviesada parece ser necessária para gerar a imunidade humoral parasita-específica e melhor controle de parasitas em animais C57BL/6 (BRYAN *et al.*, 2010). Assim, a manutenção da velocidade e/ou intensidade da resposta Th1, especialmente devida à liberação de IFN- γ , pode explicar parcialmente a melhor resposta humoral e resistência à infecção (BRYAN *et al.*, 2010) em animais idosos tratados com rapamicina do que em animais idosos não tratados.

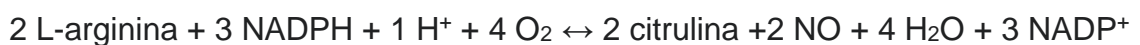
Evidências atuais indicam que altos títulos de anticorpos nem sempre são benéficos na doença de Chagas. Conseqüentemente, a alta produção de anticorpos não específicos pode desencadear reações intensas contra auto-antígenos a partir de processos de reação cruzada, agravando a miocardite induzida por *T. cruzi* (SPINELLA *et al.*, 1992; BRYAN *et al.*, 2010). Embora a especificidade da resposta humoral não tenha sido avaliada neste estudo, os títulos de anticorpos e a gravidade do dano cardíaco não mostraram um paralelismo observável. Ao contrário, animais

idosos não tratados exibiram uma miocardite mais exuberante e remodelação miocárdica patológica (isto é, parênquima reduzido e distribuição aumentada do estroma), apesar de produzirem menos anticorpos. Como esses resultados estiveram alinhados com a maior carga parasitária, o parasitismo cardíaco direto e a resposta celular desencadeada pelo *T. cruzi* parecem ser os principais eventos implicados no dano cardíaco nestes animais. Esta proposição é reforçada pela diminuição da carga parasitária em idosos animais pré-tratados com rapamicina, que apresentaram acentuada diminuição da inflamação e da remodelação microestrutural cardíaca. A quantificação do DNA do *T. cruzi* baseada na PCR é uma ferramenta diagnóstica relevante amplamente utilizada para avaliar a susceptibilidade e resistência à infecção e a resposta terapêutica a drogas antiparasitárias (FELIZARDO *et al.*, 2018a; MENDONÇA *et al.*, 2020b). Além disso, a carga parasitária medida a partir da quantificação do DNA é um bom preditor da infiltração de leucócitos e do dano cardíaco (CUNHA-NETO *et al.*, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2020a).

Na verdade, a carga parasitária convergiu com os resultados da ANP e NAG, mas exibiu uma relação limitada com os resultados da MPO. Nesse sentido, níveis aumentados de ANP e NAG foram observados em animais idosos infectados não tratados, semelhantes nos camundongos jovens e idosos pré-tratados com rapamicina. Essas descobertas indicaram que a rapamicina estimulou um fenótipo protetor em camundongos idosos, que foi eficaz em diminuir a inflamação cardíaca e o dano morfológico aos cardiomiócitos. O ANP é um hormônio bioativo produzido por cardiomiócitos atriais que é usado como marcador da função cardíaca e dano miocárdico na doença de Chagas (PUYÓ *et al.*, 2002). Assim, níveis elevados de ANP estão intimamente relacionados com a gravidade da cardiomiopatia chagásica e com um prognóstico negativo em infecções agudas e crônicas (PUYÓ *et al.*, 2002). Além disso, a NAG e a MPO são, respectivamente, marcadores de macrófagos e neutrófilos, muitas vezes usadas para investigar a infiltração celular em tecidos inflamados (GUEDES-DA-SILVA *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2020a). Como esperado, ambas as enzimas aumentaram nos animais infectados. Mas, a NAG esteve significativamente reduzida em animais pré-tratados com rapamicina, reforçando a diminuição efetiva da miocardite por *T. cruzi* em animais idosos infectados. Em combinação com os achados histopatológicos, essas enzimas indicaram que um melhor controle da inflamação foi associado à diminuição da infiltração e/ou ativação de macrófagos, mas com impacto limitado no recrutamento de neutrófilos. Esta é uma

descoberta interessante, pois é consistente com o perfil clássico de infiltrado inflamatório cardíaco na doença de Chagas, predominantemente formado por células mononucleares, especialmente linfócitos e macrófagos (CUNHA-NETO *et al.*, 1998, 2009).

A partir de uma abordagem mecanicista, também identificamos que o desequilíbrio das vias de óxido nítrico-sintase induzida e arginase pode estar implicado na maior suscetibilidade de animais idosos à infecção por *T. cruzi*. Assim, uma parasitemia mais intensa, maior carga parasitária e miocardite mais severa foram consistentes com o aumento da expressão do gene da Arg-1 e atividade da arginase (ARG), e redução da expressão do gene da iNOS, bem como uma redução de NO em animais idosos infectados não tratados. No entanto, essas respostas foram parcialmente inibidas pelo pré-tratamento com rapamicina. Um perfil semelhante foi observado em estudo anterior, comparando camundongos jovens e idosos de tipo selvagem (FELIZARDO *et al.*, 2018b). Contudo, diferenças na produção de NO em camundongos jovens e idosos infectados por *T. cruzi* não foram observadas em outro estudo (COLATO *et al.*, 2017). Embora não completamente esclarecidos, esses achados estão potencialmente relacionados ao modelo animal usado por esses autores, uma vez que um poderoso fenótipo celular Th1 e respostas humorais eficazes estão associadas à resistência natural de ratos Wistar, que são capazes de controlar rapidamente a infecção por *T. cruzi* sem desenvolver manifestações parasitológicas e patológicas pronunciadas (PASCUTTI *et al.*, 2003; FABRINO *et al.*, 2011). Reconhecidamente, o NO é um potente tripanocida, cuja biossíntese é ativada nas respostas Th1 e inibida por citocinas Th2, especialmente as IL-4 e IL-6 (RODRIGUES *et al.*, 2017; SANMARCO *et al.*, 2017). Macrófagos clássicos (M1) são as principais fontes de NO, produzindo este metabólito antiparasitário em resposta à estimulação de IFN- γ e TNF, os quais ativam a catálise da L-arginina mediada pela iNOS (RATH *et al.*, 2014; SANMARCO *et al.*, 2017).



Por isso, a ativação da iNOS antagoniza a via metabólica da arginase, desviando o substrato (L-arginina) para a produção de NO por macrófagos M1, que têm um fenótipo pró-inflamatório envolvido na morte de *T. cruzi* por efeitos citotóxicos diretos (RODRIGUES *et al.*, 2017; SANMARCO *et al.*, 2017). Ao contrário dos

macrófagos clássicos, a IL-4 estimula a diferenciação de macrófagos alternativos (M2), que produzem ureia e L-ornitina a partir da L-arginina (RATH *et al.*, 2014; SANMARCO *et al.*, 2017). Essas células têm perfil anti-inflamatório e seu predomínio não é desejável em órgãos parasitados, pois permitem a progressão da infecção pelo *T. cruzi* (RODRIGUES *et al.*, 2017; SANMARCO *et al.*, 2017).

Considerando o paralelismo entre uma menor ativação da arginase com a redução de iNOS, NO, IFN- γ e TNF, nossos achados reforçaram a proposição de que a rapamicina pode diminuir o declínio dependente do envelhecimento no fenótipo Th1 em camundongos. Ao contrário das expectativas, o excesso de citocinas Th1, macrófagos M1 e NO nem sempre é benéfico para o hospedeiro, pois podem agravar os danos às células deste e a gravidade da miocardite (CUNHA-NETO *et al.*, 2009; SANMARCO *et al.*, 2017). Assim, o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 é desejável para evitar uma exagerada estimulação imunológica, de modo que a presença de moléculas Th2 e macrófagos M2 em níveis adequados é importante para diminuir a inflamação cardíaca e a mortalidade de hospedeiros infectados por *T. cruzi* (SANMARCO *et al.*, 2017). No presente estudo, os níveis de NAG indicaram um maior influxo de macrófagos para o coração de camundongos idosos infectados não tratados, embora as subpopulações M1 e M2 não tenham sido quantificadas. No entanto, a expressão do gene Arginase-1 e a atividade da iNOS sugeriram uma polarização mais pronunciada de macrófagos M2 em animais idosos não tratados e de macrófagos M1 em camundongos idosos pré-tratados com rapamicina, reforçando um melhor controle parasitológico e o papel potencial desta droga na limitação da suscetibilidade à infecção por *T. cruzi* devida à imunossenescência do hospedeiro. A partir de ensaios anteriores *in vitro*, identificou-se que macrófagos e esplenócitos isolados de camundongos idosos exibiram um fenótipo Th1 diminuído, à custa do aumento da ativação de Th2 em resposta a antígenos de *T. cruzi* (FELIZARDO *et al.*, 2018b). Assim, animais idosos infectados também desenvolveram uma miocardite mais grave, que foi intimamente correlacionada à regulação positiva da arginase e marcada diminuição na produção de IFN- γ e NO (FELIZARDO *et al.*, 2018b). Portanto, o declínio funcional na atividade de células imunes (imunossenescência) de animais idosos está potencialmente ligado ao desvio da resposta imunológica em direção ao fenótipo Th2, cuja diminuição pelo pré-tratamento com rapamicina pode ter sido implicado na melhora do controle de parasitas e na diminuição da inflamação cardíaca e sistêmica na doença de Chagas. Conforme relatado, o tratamento com a rapamicina

também foi eficaz em diminuir o dano microestrutural cardíaco e as anormalidades eletrocardiográficas em camundongos infectados pelo *T. cruzi* (DUQUE *et al.*, 2020), descobertas potencialmente relacionadas à indução de autofagia e controle da inflamação desencadeadas por esse medicamento. Embora a função cardíaca e a autofagia não tenham sido investigadas no presente estudo, a melhora da inflamação e da microestrutura cardíaca foi consistente com as descobertas relatadas por esses autores. Assim, esses parâmetros podem ser incorporados em estudos posteriores para comparar mecanismos adicionais associados a efeitos cardíacos funcionais e moleculares em animais jovens e idosos tratados com a rapamicina.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vistos em conjunto, nossos resultados indicaram que camundongos idosos exibiram um aumento de suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* em comparação com camundongos jovens, manifestando uma piora no controle parasitológico, intensa sistêmica inflamação e miocardite aguda associados a um fenótipo Th1 diminuído e a uma resposta humoral limitada. No entanto, o pré-tratamento com a rapamicina aumentou a resistência de camundongos idosos à infecção pelo *T. cruzi*, um efeito notável potencialmente associado à diminuição do declínio do fenótipo Th1, manifestado no aumento de fatores de resistência, como IgG total, IgG1, IgG2a, expressão e atividade de iNOS, IL-2, IFN- γ , TNF e produção de NO. Assim, melhorando o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e as defesas humorais, o pré-tratamento com a rapamicina ajudou a limitar a miocardite chagásica aguda e modular positivamente a dinâmica imunológica desencadeada pela infecção pelo *T. cruzi* em favor do hospedeiro idoso.

REFERÊNCIAS

- ABDOLI, A.; ARDAKANI, H. M. Helminth infections and immunosenescence: the friend of my enemy. **Exp. Gerontol.**, v. 133, p. 110852, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110852>. Acesso em: 10 fev 2021.
- ACOSTA RODRIGUEZ, E. V. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? **Scand. J. Immunol.**, v. 66, n. 2-3, p. 137-142, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01968.x>. Acesso em: 19 jan 2021.
- ADAM, E. *et al.* The age-related resistance of rats to *Plasmodium berghei* infection is associated with differential cellular and humoral immune responses. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 10, p. 1067-1078, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00176-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00176-0). Acesso em: 18 jan 2021.
- ALBAREDA, M. C. *et al.* Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. **J. Immunol.**, v. 183, n. 6, p. 4103-4108, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900852>. Acesso em: 14 mar 2021.
- AMEZCUA VESELY, M. C. *et al.* Interleukin-17 mediated immunity during infections with *Trypanosoma cruzi* and other protozoans. **Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.**, v. 1866, n. 5, p. 165706, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165706>. Acesso em: 14 abr 2021.
- ARRIOLA APELO, S. I. *et al.* Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. **Ageing Cell**, v. 15, n. 1, p. 28-38, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/accel.12405>. Acesso em: 12 mar 2021.
- BACHMANN, M. F.; OXENIUS, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. **EMBO Rep.**, v. 8, n. 12, p. 1142-1148, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401099>. Acesso em: 11 abr 2021.
- BARBÉ-TUANA, F. *et al.* The interplay between immunosenescence and age-related diseases. **Semin. Immunopathol.**, v. 42, p. 545-557, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00806-z>. Acesso em: 23 jan 2021.
- BASHA, S.; SURENDRAN, N.; PICHICHERO, M. Immune responses in neonates. **Expert. Rev. Clin. Immunol.**, v. 10, n. 9, p. 1171-1184, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.942288>. Acesso em: 22 fev 2021.
- BEN-YEHUDA, A.; WEKSLER, M. E. Host resistance and the immune system. **Clin. Geriatr. Med.**, v. 8, n. 4, p. 701-711, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1423129/>. Acesso em: 14 mar 2021.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 4, n. 6, p.389-396, 1962. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14015230/>. Acesso em: 21 abr 2021.

- BRODSKYN, C. I. *et al.* Characterization of antibody isotype responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.**, v.18, n. 4, p. 255-258, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(88\)90171-x](https://doi.org/10.1016/0165-2478(88)90171-x). Acesso em: 19 abr 2021.
- BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e733, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000733>. Acesso em: 17 nov 2020.
- CALDAS, S. *et al.* Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Acta Trop.**, v. 123, n. 3, p. 170-177, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.002>. Acesso em: 18 jan 2021.
- CARDILLO, F. *et al.* An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 10, p. 2597-2605, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.1830231033>. Acesso em: 20 fev 2021.
- CHEBIB, N. *et al.* Pneumonia prevention in the elderly patients: the other sides. **Aging Clin. Exp. Res.**, v. 33, p. 1091-1100, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01437-7>. Acesso em: 12 nov 2021.
- CHEN, C. *et al.* mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. **Sci Signal.**, v. 2, n. 98, p. ra75, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000559>. Acesso em: 24 set 2021.
- CHOROMANSKI, L.; KUHN, R. E. Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 55, n. 2, p. 403-408, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.55.2.403-408.1987>. Acesso em: 28 out 2020.
- COLATO, R. P. *et al.* Ageing is not associated with an altered immune response during *Trypanosoma cruzi* infection: Ageing and *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp Gerontol.**, v. 90, p. 43-51, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.01.022>. Acesso em: 13 mar 2021.
- CRISTOVÃO-SILVA, A. C. *et al.* Chagas disease: immunology of the disease at a glance. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 62, p. 15-22, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.001>. Acesso em: 15 jan 2022.
- CSABA, G. Immunity and longevity. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, v. 66, n. 1, p. 1-17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.029>. Acesso em: 11 mai 2021.
- CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 129, n. 1, p. 53-59, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00093-8). Acesso em: 23 jun 2021.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104 (suppl. 1), p. 252-258, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900032>. Acesso em: 07 mar 2021.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1998000100018>. Acesso em: 19 abr 2021.

DA MATTA GUEDES, P. M. *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e604, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000604>. Acesso em: 19 out 2021.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol. Immunol.**, v. 39, n. 9, p. 531-536, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00210-9). Acesso em: 20 set 2021.

DUQUE, T. L. A. *et al.* Rapamycin treatment reduces acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Innate Immun.**, v. 12, n. 4, p. 321-332, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000504322>. Acesso em: 14 dez 2020.

FABRINO, D. L. *et al.* Rat models to investigate host macrophage defense against *Trypanosoma cruzi*. **J. Innate Immun.**, v. 3, n. 1, p. 71-82, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000320641>. Acesso em: 02 fev 2020.

FELIZARDO, A. A. *et al.* Could age and aging change the host response to systemic parasitic infections? A systematic review of preclinical evidence. **Exp. Gerontol.**, v. 104, p. 17-27, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.01.022>. Acesso em: 10 abr 2021.

FELIZARDO, A. A. *et al.* Impact of *Trypanosoma cruzi* infection on nitric oxide synthase and arginase expression and activity in young and elderly mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 129, p. 227-236, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.031>. Acesso em: 15 abr 2021.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00322-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00322-8). Acesso em: 11 jun 2021.

GAVAZZI, G.; KRAUSE, K. H. Ageing and infection. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, n. 11, p. 659-666, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00437-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00437-1). Acesso em: 11 jul 2021.

GINALDI, L. *et al.* Immunosenescence and infectious diseases. **Microbes Infect.**, v. 3, n. 10, p. 851-857, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01443-5](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01443-5). Acesso em: 09 mai 2021.

GONÇALVES-SANTOS, E. *et al.* Sesquiterpene lactone potentiates the immunomodulatory, antiparasitic and cardioprotective effects on anti-*Trypanosoma cruzi* specific chemotherapy. **Int. Immunopharmacol.**, v. 77, p. 105961, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105961>. Acesso em: 04 nov 2020.

GUEDES-DA-SILVA, F. H. *et al.* *Trypanosoma cruzi* antigens induce inflammatory angiogenesis in a mouse subcutaneous sponge model. **Microvasc. Res.**, v. 97, p. 130-136, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.10.007>. Acesso em: 18 mai 2021.

GUPTA, S.; WEN, J. J.; GARG, N. J. Oxidative stress in chagas disease. **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.**, v. 2009, p. 190354, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2009/190354>. Acesso em: 12 mar 2021.

HAGAN, C. When are mice considered old?. **The Jackson Laboratory Blog Post**, 2017. Disponível em: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old#>. Acesso em: 16 mar 2021.

HESSE, M. *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **J. Immunol.**, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6533>. Acesso em: 12 jul 2021.

HOF, H. Mycoses in the elderly. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 29, p. 5-13, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0822-5>. Acesso em: 21 jul 2021.

HUNTER, C. A. *et al.* IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3311-3316, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9120288/>. Acesso em: 04 mar 2021.

JIANG, F. *et al.* Endothelial cell modulation of cardiomyocyte gene expression. **Exp. Cell Res.**, v. 383, n. 2, p. 111565, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111565>. Acesso em: 13 jun 2021.

LIBISCH, M. G. *et al.* Early *Trypanosoma cruzi* infection triggers mTORC1-mediated respiration increase and mitochondrial biogenesis in human primary cardiomyocytes. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 1889, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01889>. Acesso em: 29 out 2021.

MACHADO, F. S.; TANOWITZ, H. B.; RIBEIRO, A. L. Pathogenesis of Chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress. **J. Am. Heart Assoc.**, v. 2, n. 5, p. e000539, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000539>. Acesso em: 27 mai 2021.

MANNICK, J. B. *et al.* mTOR inhibition improves immune function in the elderly. **Sci. Transl. Med.**, v. 6, n. 268, p. ra179, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009892>. Acesso em: 08 abr 2021.

MANNICK, J. B. *et al.* TORC1 inhibition enhances immune function and reduces infections in the elderly. **Sci Transl Med.**, v. 10, n. 449, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1564>. Acesso em: 18 jul 2021.

MARIAPPAN, N. *et al.* TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic tempol. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 293, n. 5, p. 2726-2737, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00376.2007>. Acesso em: 17 out 2021.

MENDONÇA, A. A. S. *et al.* Could phenothiazine-benznidazole combined chemotherapy be effective in controlling heart parasitism and acute infectious myocarditis? **Pharmacol. Res.**, v. 158, p. 104907, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104907>. Acesso em: 27 mai 2021.

MENDONÇA, A. A. S. *et al.* Thioridazine aggravates skeletal myositis, systemic and liver inflammation in *Trypanosoma cruzi*-infected and benznidazole-treated mice. **Int. Immunopharmacol.**, v. 85, p. 106611, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106611>. Acesso em: 20 jun 2021.

MORASCHI, B. F. *et al.* Rapamycin improves the response of effector and memory CD8+ T cells induced by immunization with ASP2 of *Trypanosoma cruzi*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.11, p. 676183, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.676183>. Acesso em: 28 ago 2021.

MÜLLER, L.; PAWELEC, G. The Aging immune system: dysregulation, compensatory mechanisms, and prospects for intervention. In: **Handbook of the Biology of Aging**. 9th ed. Amsterdam: Elsevier, 2016. cap. 16, p. 407-431. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815962-0.00016-0>. Acesso em: 18 out 2021.

NOVAES, R. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 22, n. 4, p. 270-279, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2012.12.001>. Acesso em: 19 mar 2021.

NOVAES, R. D. *et al.* Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuates cardiac morphofunctional remodeling in experimental chagas cardiomyopathy. **Life Sci.**, v. 152, p. 210-219, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.053>. Acesso em: 12 jul 2021.

NOVAES, R. D. *et al.* Purinergic antagonist suramin aggravates myocarditis and increases mortality by enhancing parasitism, inflammation, and reactive tissue damage in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Oxidat. Med. Cell. Longev.**, v. 2018, p. 7385639, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/7385639>. Acesso em: 19 ago 2021.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis.** v. 2, n 2, p. 135-146, May-Aug 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62876>. Acesso em: 17 mar 2021.

OH, S. J.; LEE, J. K., SHIN, O. S. Aging and the immune system: the impact of immunosenescence on viral infection, immunity and vaccine immunogenicity. **Immune Netw.**, v. 19, n. 6, p. 37, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4111/in.2019.19.e37>. Acesso em: 22 nov 2021.

OLFERT, E. D.; GODSON, D. L. Humane endpoints for infectious disease animal models. **ILAR J.**, v. 41, n. 2, p. 99-104, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.99>. Acesso em: 30 jul 2021.

PAHLAVANI, M. A.; RICHARDSON, A. The effect of age on the expression of interleukin-2. **Mech. Ageing Dev.**, v. 89, n. 3, p. 125-154, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(96\)01725-3](https://doi.org/10.1016/0047-6374(96)01725-3). Acesso em: 11 ago 2021.

PASCUTTI, M. F. *et al.* Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. **Scand. J. Immunol.**, v. 58, n. 2, p. 173-179, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01262.x>. Acesso em: 28 ago 2021.

PEREZ-MAZLIAH, D.; LANGHORNE, J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. **Front. Immunol.**, v. 12, n. 5, 671, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00671>. Acesso em: 23 set 2021.

PRASANNA, S. J.; SAHA, B.; NANDI, D. Involvement of oxidative and nitrosative stress in modulation of gene expression and functional responses by IFN-gamma. **Int. Immunol.**, v. 19, n. 7, p. 867-879, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm058>. Acesso em: 17 mai 2021.

PUYÓ, A. M. *et al.* Atrial natriuretic factor as marker of myocardial compromise in Chagas' disease. **Regul. Pept.**, v. 105, n. 2, p. 139-143, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(02\)00016-2](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(02)00016-2). Acesso em: 29 ago 2021.

PYRRHO, A. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice. **Parasitol. Res.**, v. 84, p. 333-337, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004360050406>. Acesso em: 27 mai 2021.

RASHIDI, S. *et al.* The host mTOR pathway and parasitic diseases pathogenesis. **Parasitol. Res.**, v. 120, p. 1151-1166, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07070-6>. Acesso em: 04 mai 2021.

RATH, M. *et al.* M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Front. Immunol.**, v. 27, n. 5, p. 532, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>. Acesso em: 27 jul 2021.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevent acute disease, immune suppression, and death in

experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.**, v. 140, n. 12, p. 4342-4347, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3131431/>. Acesso em: 15 abr 2021.

RINK, L.; CAKMAN, I.; KIRCHNER, H. Altered cytokine production in the elderly. **Mech. Ageing Dev.**, v. 102, n. 2-3, p. 199-209, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(97\)00153-x](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(97)00153-x). Acesso em: 13 ago 2021.

RODRIGUES, J. P. F. *et al.* *S. Mansoni-T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, v. 66, p. 43-52, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.02.013>. Acesso em: 12 jan 2021.

ROFFÊ, E. *et al.* IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 188, n. 2, p. 649-660, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003845>. Acesso em: 08 jan 2021.

ROGGERO, E. *et al.* Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 128, n. 3, p. 421-428, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01874.x>. Acesso em: 13 fev 2021.

ROJAS MÁRQUEZ, J. D. *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibition in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages leads to an intracellular profile that is detrimental for infection. **Front. Immunol.**, v. 9, p. 313, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00313>. Acesso em: 21 mar 2021.

ROMANHA, A. J. *et al.* Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/342415>. Acesso em: 19 abr 2021.

SANMARCO, L. M. *et al.* IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.**, v. 1863, n. 4, p. 857-869, Apr 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006>. Acesso em: 18 fev 2021.

SANTORO, A.; BIENTINESI, E.; MONTI, D. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? **Ageing Res. Rev.**, v. 71, p. 101422, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101422>. Acesso em: 14 dez 2021.

SANTOS, E. C. *et al.* Concomitant benznidazole and suramin chemotherapy in mice infected with a virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 59, n. 10, p. 5999-6006, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00779-15>. Acesso em: 22 jan 2021.

SIMON, A. K.; HOLLANDER, G. A.; MCMICHAEL, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proc. R. Soc. B.**, v. 282, p. 20143085, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>. Acesso em: 18 mai 2021.

SINIGAGLIA, F.; D'AMBROSIO, D.; ROGGE, L. Type I interferons and the Th1/Th2 paradigm. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23, n. 7-8, p. 657-663, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(99\)00039-7](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00039-7). Acesso em: 27 mar 2021.

SOUZA-SILVA, T. G. *et al.* Could angiotensin-modulating drugs be relevant for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection? A systematic review of preclinical and clinical evidence. **Parasitology**, v. 146, n. 7, p. 914-927, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S003118201900009X>. Acesso em: 30 jun 2021.

SOUZA-SILVA, T. G. *et al.* Impact of diminazene aceturate on renin-angiotensin system, infectious myocarditis and skeletal myositis in mice: an in vitro and in vivo study. **Life Sci.**, v. 257, p. 118067, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118067>. Acesso em: 25 mai 2021.

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp. Parasitol.**, v. 74, n. 1, p. 46-56, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(92\)90138-z](https://doi.org/10.1016/0014-4894(92)90138-z). Acesso em: 15 ago 2021.

STORDEUR, P. *et al.* Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **J Immunol Method.**, v. 259, n. 1-2, p. 55-64, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(01\)00489-6](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(01)00489-6). Acesso em: 21 ago 2021.

TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. The possible mechanism of action of IgG antibodies and platelets protecting against *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, n. 8, p. 759-765, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1797263/>. Acesso em: 07 jun 2021.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Host resistance to parasitic diseases. In: **Veterinary Parasitology**. 4th ed. Hoboken (N.J.): John Wiley & Sons, 2015. cap. 7, p. 343-351. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781119073680.ch7>. Acesso em: 16 mai 2021.

TSAFARAS, G. P.; NTONTSI, P.; XANTHOU, G. Advantages and limitations of the neonatal immune system. **Front. Pediatr.**, v. 8, p. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00005>. Acesso em: 03 abr 2021.

WALTERS, H. E.; COX, L. S. mTORC inhibitors as broad-spectrum therapeutics for age-related diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 8, 2325, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19082325>. Acesso em: 08 jul 2021.

APÊNDICE A – Artigo publicado

Experimental Gerontology 159 (2022) 111676



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/exger



Chronic rapamycin pretreatment modulates arginase/inducible nitric oxide synthase balance attenuating aging-dependent susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection and acute myocarditis

Margarida Pereira-Santos^a, Elda Gonçalves-Santos^b, Matheus Augusto Souza^a, Ivo Santana Caldas^{a,c,d}, Graziela Domingues Almeida Lima^{b,c}, Reggiani Vilela Gonçalves^f, Rômulo Dias Novaes^{a,b,c,e,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas 37130-001, Minas Gerais, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas 37130-001, Minas Gerais, Brazil

^c Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas 37130-001, Minas Gerais, Brazil

^d Departamento de Patologia e Parasitologia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas 37130-001, Minas Gerais, Brazil

^e Departamento de Biologia Estrutural, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas 37130-001, Minas Gerais, Brazil

^f Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Section Editor: Christian Lauenburg

Keywords:

Aging
Chagas disease
Cardiovascular pathology
Experimental gerontology
Experimental parasitology

ABSTRACT

Considering the efficacy of rapamycin in increasing lifespan and healthspan, attenuating the aging-dependent immunological decline, we compared the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection and acute myocarditis in young and elderly mice untreated and chronically treated with this drug. Five groups were investigated: young uninfected and infected, elderly uninfected and infected with *Trypanosoma cruzi* untreated and treated with rapamycin (4 mg/kg every 3 days) from the 8th to the 96th week of age. Seven days after the last treatment, elderly mice were inoculated with *T. cruzi*. Young animals were infected at 8-weeks-old. Untreated elderly mice exhibited increase parasitemia, parasite load and myocarditis, which were associated to down-regulation in IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, anti-*T. cruzi* immunoglobulin G (IgG) total, IgG1 and IgG2a plasma levels, inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression and nitric oxide (NO) cardiac production, as well as upregulation in *Arginase-1* gene expression and arginase activity compared to young animals. These parameters were improved in rapamycin-pretreated elderly mice, which exhibited a better parasitological control, reduced heart inflammation and microstructural damage. These responses were associated with a better balance between Th1 and Th2 effectors similar to that observed in young animals, including an improved activation of Th1 cytokines and the iNOS pathway that positively regulates NO biosynthesis, contradicting the predominant activation of the arginase pathway in untreated elderly animals. Thus, our findings suggest that chronic pretreatment with rapamycin can attenuate immunosenescence in mice, contributing to prolong parasite resistance and attenuate acute myocarditis in elderly host challenged by *T. cruzi*.

1. Introduction

The activity of the immune system exhibits a marked age-dependent determination and has been associated with longevity (Simon et al., 2015; Csaba, 2019). From a curvilinear behavior throughout life cycles, the immune system is less effective at the extremes of age (Simon et al., 2015; Müller and Pawelec, 2016). This variation is directly associated to the incomplete phenotypic maturity observed in the immediate

postnatal period (Basha et al., 2014; Tsafaras et al., 2020), as well as in response to the cellular and molecular deterioration that develops in aged organisms (Simon et al., 2015; Barbé-Tuana et al., 2020). Over aging, this decline is characterized as immunosenescence, which manifests as a gradual reduction in morphofunctional phenotypic variability and down-regulation of innate and adaptive cellular and humoral responses to new antigens (Simon et al., 2015; Barbé-Tuana et al., 2020). As expected, this process is directly implicated in the increased

* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Biologia Estrutural, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas 37130-001, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: romulo.novaes@unifal-mg.edu.br (R.D. Novaes).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111676>

Received 25 November 2021; Received in revised form 17 December 2021; Accepted 20 December 2021

Available online 27 December 2021

0531-5565/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



DECLARAÇÃO DE ENTREGA DE DISSERTAÇÃO

Declaramos que recebemos da discente **MARGARIDA PEREIRA SANTOS**, uma cópia digital em pdf de sua Dissertação intitulada “**Impacto do inibidor da via m-TOR rapamicina na susceptibilidade à infecção por Trypanosoma cruzi dependente do envelhecimento**” e o Termo de Autorização para publicação de Teses e Dissertações da UNIFAL-MG, devidamente preenchido e assinado.

Declaramos ainda que a discente foi orientada a adequar o trabalho conforme o Manual de normalização e apresentação de trabalhos acadêmicos da UNIFAL-MG e que o conteúdo do mesmo não sofreu alteração/correção pela equipe de Bibliotecários do SIBI/UNIFAL-MG.

Alfenas, 27 de julho de 2022

Ronan Lázaro Gondim
Bibliotecário-Documentalista
CRB/6-2504

Campus Alfenas

Recibo de nada consta



Declaramos que o(a) usuário(a) MARGARIDA PEREIRA SANTOS, cadastrado(a) na biblioteca sob nº 282986, não possui pendências de empréstimos, devoluções ou multas junto à Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas.

Alfenas, 12/07/2022.

Simioni Osório de Oliveira

Biblioteca Central
R. Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Prédio "O"
37130-001 Alfenas-MG
Tel.: 35 3701 9050

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO ELETRÔNICA NA BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES DA UNIFAL-MG

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas – SIBI/UNIFAL-MG a disponibilizar, por meio da Biblioteca de Dissertações e Teses da UNIFAL-MG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei n. 9610/98, o texto integral da publicação abaixo citada, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1- **Identificação do material bibliográfico:** Dissertação Tese

2- **Identificação do trabalho:**

Autor: Margarida Pereira Santos

RG: 41920808-2 CPF: 312839558-65

e-mail: margarida.santos@sou.unifal-mg.edu.br

Título do trabalho: **Impacto do inibidor da via m-TOR rapamicina na susceptibilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi* dependente do envelhecimento.**

Programa de pós-graduação em: Ciências Biológicas

Área CNPQ: Ciências Biológicas (2.00.00.00-6)

Área de Concentração: Interação patógeno-hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes

CPF: 062559606-41 e-mail: romulo.novaes@unifal-mg.edu.br

Instituição: UNIFAL-MG

Data da defesa: 30/06/2022.

Título obtido: Mestre em Ciências Biológicas

3- **Agência de fomento (em caso de alunos bolsistas)**

4- **Informações de acesso ao documento no formato eletrônico:**

Disponibilização do trabalho completo:

Imediata: Não

Daqui a 1 ano

Justificativa: Conteúdo recentemente publicado em periódico internacional especializado. Embargo de 12 meses.

- A restrição poderá ser mantida por até 1 (um) ano a partir da data da autorização, desde que devidamente justificada.
- A prorrogação dos prazos suscita justificativa junto às Bibliotecas do SIBI/UNIFAL-MG.
- O resumo e os metadados ficarão sempre disponibilizados.

Alfenas, 08/07/2022.



Assinatura do (a) autor (a) ou seu representante legal



Assinatura do orientador



FORMULÁRIO PARA PREENCHIMENTO DE CADASTRO NA PLATAFORMA SUCUPIRA

Discente: Margarida Pereira Santos

Título da Dissertação: Impacto do inibidor da via m-TOR rapamicina na susceptibilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi* dependente do envelhecimento

Data de realização de defesa: 30/06/2022

Título Obtido: (X) Mestre () Doutor

Resumo (dissertação): Considerando a eficácia da rapamicina em aumentar a expectativa de vida e de saúde, reduzindo o declínio imunológico dependente do envelhecimento, comparamos a evolução da infecção por *Trypanosoma cruzi* e miocardite aguda em camundongos jovens e idosos não tratados e cronicamente tratados com esta droga. Cinco grupos de animais foram investigados: jovens não infectados e infectados, idosos não infectados e infectados com *Trypanosoma cruzi* não tratados e tratados com rapamicina (4 mg / kg a cada 3 dias) da 8^a à 96^a semanas de idade. Sete dias após o último tratamento, camundongos idosos foram inoculados com *T. cruzi*. Os animais jovens foram infectados com 8 semanas de idade. Camundongos idosos não tratados exibiram aumento de parasitemia, carga parasitária e miocardite, que foram associados à diminuição de níveis plasmáticos de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, imunoglobulina anti-*T. cruzi* (IgG total, IgG1 e IgG2a), expressão do gene da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e produção cardíaca de óxido nítrico (NO), bem como aumento da expressão do gene da *Arginase-1* e atividade da arginase (ARG) em comparação com animais jovens. Esses parâmetros melhoraram em camundongos idosos pré-tratados com rapamicina, que exibiram um melhor controle parasitológico, reduziram a inflamação cardíaca e danos microestruturais. Essas respostas foram associadas a um melhor equilíbrio entre os efetores Th1 e Th2, semelhante ao observado em animais jovens, incluindo uma ativação melhorada de citocinas Th1 e a via do iNOS que aumenta a biossíntese de NO, contrariando a ativação predominante da via da arginase em animais idosos não tratados. Assim, nossos resultados sugerem que o pré-tratamento crônico com rapamicina pode reduzir a imunossenescência em camundongos,



contribuindo para prolongar a resistência ao parasita e reduzir a miocardite aguda em hospedeiro idoso infectado por *T. cruzi*.

Palavras-chave: Envelhecimento. Doença de Chagas. Patologia cardiovascular. Gerontologia experimental. Parasitologia experimental.

Abstract: Considering the efficacy of rapamycin in increasing lifespan and healthspan, attenuating the aging-dependent immunological decline, we compared the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection and acute myocarditis in young and elderly mice untreated and chronically treated with this drug. Five animal groups were investigated: young uninfected and infected, elderly uninfected and infected with *Trypanosoma cruzi* untreated and treated with rapamycin (4 mg/kg every 3 days) from the 8th to the 96th week of age. Seven days after the last treatment, elderly mice were inoculated with *T. cruzi*. Young animals were infected at 8-weeks-old. Untreated elderly mice exhibited increase parasitemia, parasite load and myocarditis, which were associated to plasma levels down-regulation of IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF, anti-*T. cruzi* immunoglobulin G (IgG) total, IgG1 and IgG2a, inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) gene expression and nitric oxide (NO) cardiac production, as well as upregulation in *Arginase-1* gene expression and arginase activity (ARG) compared to young animals. These parameters were improved in rapamycin-pretreated elderly mice, which exhibited a better parasitological control, reduced heart inflammation and microstructural damage. These responses were associated with a better balance between Th1 and Th2 effectors similar to that observed in young animals, including an improved activation of Th1 cytokines and the *iNOS* pathway that positively regulates NO biosynthesis, contradicting the predominant activation of the arginase pathway in untreated elderly animals. Thus, our findings suggest that chronic pretreatment with rapamycin can attenuate immunosenescence in mice, contributing to prolong parasite resistance and attenuate acute myocarditis in elderly host challenged by *T. cruzi*.

Keywords: Aging. Chagas disease. Cardiovascular pathology. Experimental gerontology. Experimental parasitology



Volume: 1

Número de Páginas: 47

Biblioteca Depositada: Biblioteca Central da UNIFAL-MG

Área de Concentração:

- Biologia Celular, Molecular e Estrutural das doenças agudas e crônicas:**
 Interação Patógeno-Hospedeiro:

Participou de Projeto de Pesquisa? Sim Não

Qual? Impacto do inibidor da via m-TOR rapamicina na susceptibilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi* dependente do envelhecimento

Banca Examinadora:

Titular/Presidente (Orientador): Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes
CPF: 062559606-41

Titular Externo: Profa. Dra. Eliziária Cardoso dos Santos
CPF: 044570896-48

Titular Interno: Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
CPF: 087867927-84

Foi bolsista durante o curso? Sim Não

Em caso positivo, qual foi o período?

Financiador:

- CAPES
 FAPEMIG
 CNPQ
 Outro:

Autoriza divulgação do trabalho? Sim Não



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



ATIVIDADE FUTURA:

Vínculo empregatício?

- CLT
- Servidor Público
- Aposentado
- Colaborador
- Bolsa de fixação

Tipo de instituição

- Empresa pública ou estatal
- Empresa privada
- Outros
- Instituição de ensino e pesquisa

Expectativa de atuação

- Ensino e pesquisa
- Pesquisa
- Empresas
- Profissional autônomo
- Outros



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



Tabela 3 – INFORMAÇÕES SOBRE CO-ORIENTADOR

Nome completo	
Abreviatura em publicações	
CPF	
Nacionalidade	
E-mail	
Instituição de ensino superior de origem (nome completo e sigla):	
TITULAÇÃO	
Nível mais elevado	
Ano de obtenção	
Área do conhecimento (Capes):	
Nome e sigla da Instituição concedente do maior título:	

CONTATO DO ALUNO

Logradouro: Rua Altino Bastos Carneiro, 346
Bairro: Jardim Aeroporto
Cidade/Estado/País: Alfenas/MG/Brasil
CEP: 37130-816
Telefone/e-mail: (35) 984373847 / margarida.santos@sou.unifal-mg.edu.br

Observação: favor preencher todos os campos e enviar o formulário para o e-mail ppgcb@unifal-mg.edu.br junto com a cópia em formato .pdf ou .doc da dissertação.

Assinatura Discente :

Orientador: