

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM NEUROCIÊNCIAS**

**TREINAMENTO FÍSICO E NEUROIMUNOMODULAÇÃO EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE TRIPANOSOMÍASE AMERICANA**

**LUCIANO REZENDE VILELA**

**BELO HORIZONTE, MG  
OUTUBRO/2009**

**LUCIANO REZENDE VILELA**

**Treinamento Físico e Neuroimunomodulação em  
Modelo Experimental de Tripanosomíase Americana**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
Outubro/2009**

Esta dissertação foi realizada no Laboratório Professora Conceição Machado do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação da Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva e com o apoio financeiro do CNPq e da FAPEMIG.

## **Dedicatória**

**À minha mãe**, meu porto seguro, que é fundamental na minha vida, obrigado pela confiança, dedicação, suporte e pelos constantes ensinamentos.

**Ao meu pai**, pelo exemplo de luta, garra, determinação e trabalho.

**Aos irmãos e familiares**, por todo incentivo e admiração pelo meu trabalho.

**À Andréa Baeta**, pelo amor incondicional, carinho, apoio e pelo companheirismo.

**À Professora Elizabeth Ribeiro da Silva**, pelo seu profissionalismo, seriedade, honestidade e paciência.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela vida, saúde e possibilidade de lutar pelos meus objetivos.

À professora **Elizabeth Ribeiro da Silva** pela orientação, pela oportunidade, paciência, profissionalismo e sabedoria.

As demais professoras do Laboratório Professora Conceição Machado, **Patrícia Massara**, pela dedicação diária, experiência e auxílio, à **Leonor Guerra e Luciana Andrade** pelo exemplo de conhecimento.

Aos amigos de laboratório, **Bárbara Hissa, Letícia Alberti, Fábio Braga, Ísis Tacyana, Cecília Marques** e principalmente a **Luciana Hoffert e Andréa Moraes** pela amizade e imenso apoio proporcionado durante todo tempo.

Aos alunos de iniciação científica que trabalharam comigo, **Samira Nagem, Igor Soares, Vágner Simões, Bárbara Carvalho, Glauber Eliazar, Mateus Matos e Raphael Carrusca** e todos que fazem parte do nosso grupo de pesquisa.

Ao técnico **Carlos Henrique** pela paciência, ajuda e suporte técnico.

Ao meu amigo e irmão **Rafael Machado**, pelos muitos anos de amizade, companheirismo e incentivo.

Ao amigo **Gustavo Menezes**, por toda sua confiança, ajuda, amizade e generosidade.

Ao casal **Flaviana e André Luís** pela confiança e incentivo.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós Graduação em Neurociências.

Aos professores do Departamento de Morfologia.

Ao **Professor Cândido Coimbra** pela colaboração e gentileza.

**Aos meus pais, irmãos, cunhados** e aos meus pequenos **João Gabriel e Ana Clara** por serem pessoas especiais na minha vida.

Ao meu grande amor **Andréa Baeta** pelo carinho, amor, incentivo e compreensão.

À **família Lemos Baeta** por sempre me acolher e incentivar durante esse tempo.

Aos amigos, **Andréia Aguiar, Glayson Monteiro e Luiz Carlos Basseto** pelas nossas valiosas conversas.

Aos amigos de Três Corações e a todos que acreditaram e torceram por mim.

As agências financiadoras de pesquisa CAPES e Fapemig.

## SUMÁRIO

Lista de figuras	9
Lista de tabelas	12
Lista de abreviaturas	13
Resumo	15
Abstract	16
<b>1. Introdução e justificativa</b>	<b>18</b>
1.1 Doença de Chagas.	18
1.2 Treinamento físico e neuroimunomodulação	22
<b>2. Objetivos</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivos específicos	29
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>31</b>
3.1 Animais	31
3.2 Delineamento experimental	31
3.3 Ambientação e Aclimatação em corrida à esteira	32
3.4 Avaliação do desempenho físico	32
3.5 Treinamento físico	33
3.6 Infecção com <i>T. cruzi</i>	33
3.7. Parasitemia	33
3.8 Sacrifício dos animais	33
3.9 Homogeneização das amostras	34
3.10 Técnicas Histológicas e Histométricas	34
3.11 Dosagem de BDNF e NGF por ELISA	35
3.12 Dosagem de citocinas por ELISA	36

3.13	Quantificação de proteína total	36
3.14	Análise Estatística	37
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>39</b>
4.1	Parasitemia	39
4.2	Peso corporal	39
4.3	Análise Histológica e Histométrica	40
4.3.1	Medula espinhal	40
4.3.2	Músculo Sóleo	41
4.4	Níveis teciduais e séricos de fatores neurotróficos	44
4.4.1	Medula Espinhal	44
4.4.2	Ciático	45
4.4.3	Músculo Sóleo	48
4.4.4	Níveis séricos	48
4.5	Níveis teciduais de citocinas	50
4.5.1	Medula espinhal	50
4.5.2	Músculo Sóleo	53
4.5.3	Níveis Séricos	56
<b>5.</b>	<b>Discussão</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Delineamento experimental dos animais submetidos à infecção pela cepa Y de *T. cruzi* após treinamento em esteira por três semanas. 31
- Figura 2 Valores médios diários de parasitemia de ratos inoculados aos 57 dias de idade com 300.000 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi*, submetidos (n=11) ou não (n=11) a treinamento físico em esteira por três semanas. 39
- Figura 3 Peso corporal médio de ratos infectados aos 57 dias de idade com a cepa Y de *T. cruzi* submetidos (n=11) ou não (n=11) a treinamento físico em esteira por três semanas e seus respectivos controles treinados (n=12) e não treinados (n=12). 40
- Figura 4 Fotomicrografias de secções do músculo sóleo de ratos adultos com 14 ou 20 dias de infecção com a cepa Y de *T. cruzi* submetidos ou não a treinamento físico em esteira por três semanas e seus respectivos controles treinados e não treinados. 60
- Figura 5 Fotomicrografias de secções da região lombar da medula espinhal de ratos adultos com 14 ou 20 dias de infecção com a cepa Y de *T. cruzi* submetidos ou não a treinamento físico em esteira por três semanas e seus respectivos controles treinados e não treinados. 62
- Figura 6 Proporção volumétrica no músculo sóleo de animais treinados e infectados pela cepa Y de *T. cruzi* dos grupos com 14 e 20 dias de infecção. (A) Infiltrado de células inflamatórias (B) Ninhos de amastigotas (n=5 por grupo). 43
- Figura 7 Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 44

Figura 8 Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	45
Figura 9 Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no nervo ciático de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	46.
Figura 10 Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no nervo ciático de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	47
Figura 11 Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no músculo sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	48
Figura 12 Níveis de BDNF (pg/ml) no soro de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	49
Figura 13 Níveis de NGF (pg/ml) no soro de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	50
Figura 14 Níveis de TNF $\alpha$ (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	51
Figura 15 Níveis de IL-10 (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T.</i>	52

*cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.

Figura 16 Níveis de IFN $\gamma$  (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 53

Figura 17 Níveis de TNF $\alpha$  (pg/mg de proteína total) no músculo sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 54

Figura 18 Níveis de IL-10 (pg/mg de proteína total) no músculo sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 55

Figura 19 Níveis de IFN $\gamma$  (pg/mg de proteína total) no músculo sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 56

Figura 20 Níveis de TNF $\alpha$  (pg/ml) no soro de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 57

Figura 21 Níveis de IL-10 (pg/ml) no soro de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 58

Figura 22 Níveis de IFN $\gamma$  (pg/ml) no soro de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. 59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise histométrica (%) no músculo sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	42
Tabela 2 Resumo dos resultados obtidos das dosagens de fatores neurotróficos e citocinas por ELISA de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i> , e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro  
BSA - Albumina sérica bovina  
cAMP - Adenosina monofosfato  
CD8<sup>+</sup> - Linfócitos T citotóxico  
CH – Animal chagásico  
CREB - Elemento de ligação a proteínas de resposta ao cAMP  
ED1<sup>+</sup> - Macrófagos recrutados  
ED2<sup>+</sup> - Macrófagos residentes  
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
GAP-43 – Proteína associada ao crescimento  
GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Glia  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Peróxido de Hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Ácido sulfúrico  
ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1  
IFN $\gamma$ - Interferon gama  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-12 – Interleucina 12  
IL1-ra – Antagonista do receptor de IL-1  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 Beta  
IL-6 – Interleucina 6  
LPS – Lipopolisacarídeo  
NGF- Fator de Crescimento Neural  
NK – Células *natural killers*  
NO - Óxido nítrico  
NOS<sub>i</sub> - Óxido nítrico sintase induzível  
NT-3 - Neurotrofina 3  
NT-4 - Neurotrofina 4  
P75NTR - Receptor p75  
PBS - Tampão salina fosfato  
RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro  
SNC – Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

Tc-TOX- Proteína liberada pelo *T. cruzi* que auxilia no rompimento do vacúolo

TGF- $\beta$  - Fator de Crescimento Transformante beta

tGPI mucinas – Âncoras de glicosilfosfatilinositol

Th-1- Célula T helper 1

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

Trk - Receptor do tipo tirosina kinase

## RESUMO

No presente trabalho investigamos os efeitos do treinamento físico em esteira sobre a fase aguda da infecção experimental com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* em ratos adultos. Os animais foram submetidos, previamente à infecção, a treinamento por três semanas consecutivas. Analisamos a expressão de fatores neurotróficos (BDNF e NGF) e citocinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10) na região lombar da medula espinhal, no nervo ciático, no músculo sóleo e em soro durante a fase aguda da infecção. Demonstramos, por análise histométrica, que o treinamento físico atrasa a instalação do infiltrado inflamatório no músculo sóleo. Na região lombar da medula espinhal, observamos nódulos glioinflamatórios e parasitismo de células gliais nos animais treinados e não treinados no vigésimo dia de infecção. Mostramos também que a infecção com a cepa Y de *T. cruzi* em ratos adultos resulta em expressão aumentada de BDNF na medula espinhal independente do treinamento físico. Nossos resultados indicam a relevância do estudo do efeito do treinamento físico sobre a infecção experimental com *T. cruzi* no sistema neuromuscular de ratos adultos.

## ABSTRACT

In the present study we investigated the effects of physical training on treadmill on the acute phase of Y strain *T. cruzi* infection in adult rats. The treadmill training was carried out for three weeks. We analyzed the expression of neurotrophic factors (BDNF and NGF) and cytokines (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-10) in the lumbar spinal cord, sciatic nerve, skeletal muscle and serum during the acute phase of this infection. We have demonstrated by histometric analysis that physical training delays the establishment of the inflammatory process in the soleus muscle. Our results showed the occurrence of glioinflammatory nodules and parasitism of glial cells in all the infected animals submitted or not to treadmill training. We also have shown that infection the *T. cruzi* infection in adult rats results in increased expression of BDNF in the spinal cord. Our results indicate the importance of further studies about the effects of physical training on the experimental infection with *T. cruzi* in the neuromuscular system of adult rats.

## **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## 1 Introdução e Justificativa

### 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, zoonose que tem como agente etiológico um hemoflagelado da ordem Kinetoplastida, *Trypanosoma cruzi*, constitui importante problema de saúde pública na América Latina. Estima-se que 9 milhões de pessoas estejam infectadas no continente e cerca de 40 milhões sob risco de infecção. Nos últimos 20 anos, o número de pessoas infectadas regrediu de modo significativo, como resultado de iniciativas que visaram a eliminação do vetor – insetos triatomíneos - e o controle de outras formas de transmissão, como a transfusão de sangue (Schofield *et al.*, 2006).

A transmissão vetorial da doença de Chagas faz-se pelas fezes do inseto vetor contaminado ao sugar o sangue de vertebrados infectados. No Brasil, o *Triatoma infestans* era o principal triatomíneo transmissor desta infecção. Desde 2006, no entanto, a Organização Panamericana de Saúde considera esta espécie eliminada do Brasil (Massad *et al.* 2008). Outras formas de transmissão abrangem a transfusão sanguínea, responsável por 10% dos casos, o transplante de órgãos, o consumo de alimentos contaminados com fezes do inseto infectado e, em menores proporções, acidentes laboratoriais (Prata , 2001; Massad *et al.* 2008).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* inicia-se, no hospedeiro vertebrado, pela penetração de tripomastigotas metacíclicos - forma infectante eliminada nas fezes do inseto vetor – em regiões de descontinuidade da pele ou em mucosas (Brenner, 1987; revisado por Teixeira, 2006). Nestas regiões, estabelece-se, usualmente, uma reação inflamatória denominada “chagoma” de inoculação. O parasita é capaz de invadir células hospedeiras locais e em outros órgãos, mediante circulação pela corrente sanguínea.

Nas células hospedeiras, os tripomastigotas são encontrados, inicialmente, em vacúolos parasitóforos formados por associação de lisosomas com a membrana plasmática da célula alvo, processo que envolve a participação de moléculas de superfície do parasita e da célula alvo, além de cálcio. A exposição dos tripomastigotas ao ambiente ácido do vacúolo resulta na produção de proteínas, entre elas a Tc-TOX, no rompimento do vacúolo e

escape do parasita para o citoplasma, bem como sua diferenciação em amastigota - forma intracelular replicativa - e conseqüente formação de “ninhos” de amastigotas ou “pseudocistos”. Os amastigotas posteriormente se diferenciam em tripomastigotas que são liberados da célula hospedeira mediante a ruptura de membrana plasmática (Brenner, Z, 1973; Carvalho e De Souza, 1989; Burleigh & Andrews, 1995).

A ruptura dos “ninhos” desencadeia processo inflamatório em que predominam células mononucleares. Concomitantemente, pode ocorrer febre, linfadenopatia, esplenomegalia moderada, dentre outros sinais clínicos (Prata, 2001). Sabe-se que moléculas derivadas do *T. cruzi*, como as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (tGPI mucinas) apresentam ação estimuladora da síntese de citocinas e quimiocinas por macrófagos e outras células do sistema imunitário (Teixeira *et al.*, 2002).

A fase inicial da infecção, ou fase aguda, dura em torno de dois meses, sendo usualmente assintomática e de difícil diagnóstico em 66-99% dos indivíduos infectados (Pitella, 2009). Esta fase caracteriza-se pela presença de tripomastigotas no sangue, parasitismo e processo inflamatórios nos tecidos, de intensidade variável. Nessa fase, o parasita infecta principalmente músculos cardíacos, esqueléticos e lisos, podendo também acometer outros tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, e células gliais (Andrade *et al.*, 2002; Prata, 2001; Andrade, 2000). O tratamento é bem sucedido em 70% dos indivíduos diagnosticados logo depois da infecção (revisado por Rassi *et al.*, 2007).

A fase aguda pode ser letal em crianças e em indivíduos adultos imunossuprimidos (Prata, 2001; Massad, 2008).

O controle da fase aguda da infecção depende, principalmente, da produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), inicialmente por células *natural killers* (NK) e, posteriormente, por células CD4<sup>+</sup>. O IFN- $\gamma$  inibe a rápida multiplicação do parasita e é capaz de ativar macrófagos, em sinergia com TNF- $\alpha$  (Tarleton, 1988). Os macrófagos ativados sintetizam óxido nítrico (NO), via óxido nítrico sintase induzível (NOSi), de importância na eliminação do parasita (Munhoz-Fernandes, 1992). A produção aumentada de NO sob estímulo de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  parece estar relacionada ao controle da parasitemia e à resistência à infecção (Vespa *et al.*, 1994).

A interleucina (IL)-12 é outra citocina essencial para a resistência à infecção por induzir a síntese de IFN $\gamma$  e da própria IL-12 por macrófagos. Outra via importante relacionada com a proteção do hospedeiro e controle parasitário é a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 (Silva *et al.*, 1998; Une *et al.*, 2003;).

Por sua vez, a interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) são moduladores da resistência do hospedeiro ao parasita durante a fase aguda da Doença de Chagas e influenciam a síntese e os efeitos mediados pela IL-12.

Na fase crônica da doença ocorre diminuição do número de parasitas no sangue, geralmente não detectados em exame de gota espessa, e nos tecidos. Essa fase pode ser caracterizada por três formas clínicas. A de longo período de latência clínica - forma indeterminada ou assintomática – pode se estender por 10 a 30 anos ou mesmo toda a sobrevida do paciente e acomete aproximadamente 70% dos pacientes. A forma cardíaca, também denominada cardiomiopatia chagásica (Köberle, 1968) com altos índices de mortalidade decorrente de insuficiência cardíaca congestiva e a digestiva, com desenvolvimento de megacolon e megaesôfago (Prata, 2001; Teixeira *et al.*, 2006). A progressão da fase crônica depende da resposta imune eficiente do hospedeiro (Savino *et al.*, 2007), bem como do tropismo tecidual, tempo de infecção, variabilidade genética e quantidade parasitária (Dutra & Gollob , 2008).

Cabe destacar, neste ponto, que em 2009 completa-se 100 anos da descrição inicial desta infecção por Carlos Chagas, médico sanitário e pesquisador responsável pela identificação do agente etiológico e do inseto transmissor, e pela descrição dos sintomas clínicos.

A seguir, abordaremos os aspectos histopatológicos da doença de Chagas pertinentes ao tema desta dissertação, em especial aqueles relacionados com modelos experimentais desta infecção.

O envolvimento do SNC é descrito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (Pittella, 1993; Rocha *et al.*, 1994; Oddó, *et al.*, 1992; Lages-Silva *et al.*, 2002), em pacientes submetidos à terapia imunossupressora (Jost *et al.*, 1977) e em crianças com idade abaixo de dois anos. Nestes casos, os pacientes desenvolvem meningoencefalite aguda e tripomastigotas são detectados no líquido cerebrospinal (Hoff, 1978).

Estudos recentes fornecem evidências epidemiológicas de associação entre infecção com *T. cruzi* e deterioração cognitiva através de avaliação do estado mental em pacientes chagásicos crônicos (Lima-Costa *et al.*, 2009). Achados através de tomografia computadorizada também demonstram que pacientes chagásicos que desenvolvem cardiopatia chagásica apresentam infartos territoriais cerebelares e ventriculares, além de diminuição do volume cerebral total quando comparados com pacientes com outras formas de cardiopatias (Oliveira Filho *et al.*, 2009).

Modelos experimentais em camundongos e a prática clínica em pacientes chagásicos revelaram importantes lesões no sistema neuromuscular (Sica *et al.*, 1979; Molina, 1987; Tekiel *et al.*, 2001) comprovadas mediante estudos eletrofisiológicos, histológicos e imunohistoquímicos (González-Cappa *et al.*, 1987, 1993; Mirkin *et al.*, 1994). Tais lesões incluem inflamação, diminuição de fibras motoras mielínicas, redução da velocidade de condução em fibras motora e sensitivas, degeneração axonal em motoneurônios espinhais (Bijovsky *et al.*, 1983; Molina, 1987; Tekiel, 2001).

Essa degeneração está associada a infiltrado vascular no gânglio sensitivo da raiz dorsal e na raiz espinhal, nas meninges e na região lombar da medula espinhal (Sica, 1995), composto principalmente de macrófagos e linfócitos T CD8+ (Molina, 1987). Estudos em camundongos infectados demonstraram lesões inflamatórias do nervo ciático composta principalmente por macrófagos na região epineural, perineural, endoneural e envolvimento da transmissão neuromuscular (Tekiel *et al.*, 2005; Goin *et al.*, 1997; Losavio *et al.*, 1989).

O Laboratório de Neurobiologia também abordou aspectos referentes ao comprometimento do sistema nervoso central nesta infecção. Demonstrou-se ser o astrócito, no sistema nervoso central, a célula-alvo do *T. cruzi*. A infecção em ratos lactentes resulta em diminuição da imunorreatividade a ocludina – proteína característica de zônula de oclusão – o que explica a gravidade da lesão cerebral em ratos nesta faixa etária. Paralelamente à redução da ocludina, ocorre aumento da expressão de ICAM-1 nos capilares do sistema nervoso central. A depleção de macrófagos periféricos em animais lactentes infectados com *T. cruzi* reduz a expressão de ICAM-1 e o parasitismo de astrócitos (Silva *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem papel dos macrófagos

na indução da expressão de ICAM-1 e na entrada do parasita no sistema nervoso central.

No que se diz respeito ao envolvimento muscular na infecção experimental, descreve-se a ocorrência de parasitismo e miosite, assim como degeneração e necrose de miofibras durante a fase aguda e crônica. (Bijovsky, 1983; Molina, 1987; Losavio *et al.*, 1989, Montéon *et al.*, 1996).

Resultados anteriores do laboratório mostraram diminuição significativa da atividade da colina acetiltransferase nos músculos diafragma e psoas de ratos aos 20 dias de infecção por *T. cruzi* (Maldonado, 1994). Ademais, um trabalho do laboratório mostrou a ocorrência de miosite, com predomínio de macrófagos ED1+ e ED2+, além de linfócitos CD8+ e células NK em músculo esquelético de ratos aos 12 e 20 dias de infecção infectados com cepa Y de *T. cruzi* (Maldonado *et al.*, 2004). Neste estudo evidenciou-se, também, a ativação de células satélites e a regeneração de células musculares esqueléticas.

Existem ainda evidências de que fibras do tipo IIA são menos lesadas na infecção em camundongos (Teixeira & Dvorak, 1985), e que os músculos esqueléticos mais afetados pelo parasitismo e a conseqüente inflamação são o diafragma e o sóleo, caracterizados pela alta proporção de fibras tipo-I (Maldonado *et al.*, 2004).

Investigações *in vivo* e *in vitro* demonstraram interação neuroimunoendócrinas entre infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos. Nesses animais, ninhos de amastigotas eram vistos na glândula adrenal e pituitária, infiltrado inflamatório composto por macrófagos e células T, aumento dos níveis de corticosterona sérica e hipotalâmica, além de aumento dos níveis de IL-6, importante estimulador da secreção de glicocorticóides. Nesse trabalho, demonstra-se que certas áreas cerebrais, tecido nervoso periférico do plexo mioentérico, sistema endócrino e em particular o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal são alvos da infecção experimental (Correa-de-Santana *et al.*, 2006).

## 1.2 Treinamento físico e neuroimunomodulação.

Existem largas evidências de que a atividade física voluntária e o treinamento físico favorecem a plasticidade cerebral, neuroregeneração,

neuroadaptação, bem como processos neuroprotetores, sendo a chave que medeia esses benefícios a produção de fatores de crescimento e neurotróficos (Cotman *et al.*, 2007). Estas evidências têm resultado na utilização de exercício físico na prevenção e no tratamento de doenças neurológicas, como processos isquêmicos, lesões na medula espinhal, bem como no tratamento da obesidade e depressão, entre outros (Dishman *et al.*, 2006). O interesse pelo exercício físico se justifica pelo seu caráter multidimensional, ou seja, com efeitos sobre todo o organismo (Roberts & Barnard, 2005).

Ademais, o treinamento físico tem potencial efeito anti-inflamatório pela produção de IL-6, IL-1ra e IL-10 pelas fibras musculares, com inibição da produção de citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  exercendo assim uma proteção contra doenças crônicas associadas com a inflamação, como a o diabetes e doenças cardiovasculares (Petersen & Petersen, 2005). Dessa forma, a inatividade física pode contribuir para a sobrecarga pró-inflamatória, que é suprimida pela atividade muscular regular, mediada pela IL-6 (Bruunsgaard, 2005).

Outro importante benefício do exercício físico é sua ação sobre a plasticidade molecular, estrutural e funcional do músculo esquelético (Fluck, 2006).

Adicionalmente, o exercício afeta a atividade do sistema imunitário (Radak *et al.*, 2008), modulando a imunidade inata, importante reguladora do processo inflamatório, e a imunidade adquirida pelo recrutamento de linfócitos B, linfócitos T e células NK, aumentando a liberação de vários hormônios, peptídeos, citocinas e glutamina no plasma e estabelecendo, assim, maior resistência a doenças crônicas (Cunha *et al.*, 2004). Por outro lado, os exercícios de alta intensidade podem causar imunodepressão e aumentar a susceptibilidade à infecção, pelo aumento da secreção de cortisol, um importante regulador do sistema imune. Sendo assim, apenas exercícios de intensidade moderada proporcionam modulação do sistema imune, principalmente por aumentar a resistência contra infecções e diminuir o risco de desenvolver diversos tipos de doença (Radak *et al.*, 2008).

Dessa forma, o treinamento aeróbico regular, é largamente aceito como fator promotor da saúde e redutor da mortalidade, pelo fato de atuar também como regulador do sistema nervoso autonômico, principalmente sobre

o sistema cardiovascular (Hautala *et al.*, 2009). Isso se deve a grande capacidade do balanço autonômico proporcionado pelo treinamento físico regular, através do aumento do tônus vagal (parassimpático) e redução do tônus simpático, comprovado em humanos e modelos animais (Liu, *et al.*, 2009; Sanches 2009). Os benéficos proporcionados pelo aumento do tônus vagal após treinamento físico regular correspondem-se a efeitos anti-isquêmicos e anti-aterogênicos, influenciando na função endotelial, efeitos antiinflamatórios, arteriogênicos e angiogênicos (Zdrenghea *et al.*, 2008). Além disso, outro importante papel do nervo vago é a transmissão aferente da informação neuroimune e o papel eferente através do sistema parassimpático, como regulador sistêmico do processo inflamatório, inibindo a produção de TNF $\alpha$  por macrófagos, via ativação também da medula adrenal (Nance e Sanders, 2007).

Os principais mediadores da neuroproteção exercida pelo exercício, os fatores neurotróficos, são definidos como um grupo de polipeptídeos com capacidade de atuar sobre a diferenciação, desenvolvimento, manutenção, e sobrevivência dos componentes do sistema nervoso central e periférico (Thoenen *et al.*, 1987; Siegel e Chauhan, 2000; Alberch *et al.*, 2002; Chiaretti *et al.*, 2004).

As principais neurotrofinas expressas nos mamíferos são: NGF (*Neural Growth Factor*), BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (*Neurotrophin-3*) e NT-4 (*Neurotrophin-4*), assim como GDNF (*Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*) todas elas ativadas por duas classes de receptores: Trk (receptor tropomiosina kinase) membro da família dos receptores tirosina kinase (RTKs) e p75 NTR (receptor neurotrofina p75). Cada tipo de receptor une a neurotrofina madura com especificidade diferente, onde o receptor dimerizado se torna ativo, resultando em autofosforilação e subsequente ativação de cascatas de sinalização. Devido à multiplicidade dos sistemas de sinalização dos receptores, existem ações opostas entre eles, como por exemplo, os receptores Trk promovem sobrevivência celular e são eficazes na transmissão sináptica, enquanto os p75 medeiam a morte celular e sua deterioração funcional (Hennigan *et al.*, 2007).

A secreção dos fatores neurotróficos fica por conta de células alvo de uma determinada população neuronal, seguido por captação pela terminação nervosa pré-sináptica e transporte retrógrado até o corpo neuronal ou, até

mesmo, por via anterógrada, mediante liberação por neurônios aferentes (Levi-Montalcini, 1987; Skaper e Walsh, 1998). Existem também outras fontes de neurotrofinas, como as células gliais, os fibroblastos, os macrófagos, as células de Schwann, as células endoteliais, entre outras, todas atuando de modo parácrino no sistema nervoso central e periférico ao aporte neurotrófico (Acheson *et al.*, 1987).

Dentre os fatores neurotróficos, o BDNF é designado como fator causal na promoção dos efeitos positivos do exercício sobre o sistema fisiológico, embora haja participação expressiva também de NGF (Hennigan *et al.*, 2007).

Concomitantemente, diversos autores postularam sendo o sistema neuromuscular, Medula-Músculo Esquelético, o modelo mais adequado para avaliar os efeitos do exercício através de fatores tróficos devido à definição da via. Dessa forma, alguns estudos têm evidenciado que o treinamento físico em esteira modula a expressão de BDNF no músculo sóleo e na região lombar da medula espinhal de ratos (Gómez-Pinilla *et al.*, 2001; Seebach *et al.*, 1999) e que os “*inputs*” sensoriais dos músculos projetados para medula espinhal são as maiores fontes dessa modulação (Gómez-Pinilla *et al.*, 2004).

Segundo Vaynman *et al.*, (2003) e Gómez-Pinilla *et al.*, (2004), o BDNF medeia o efeito do exercício sobre a plasticidade sináptica e a excitabilidade neuronal através do aumento de RNAm de sinapsina I (fosfoproteína que aumenta a liberação de neurotransmissores e proporciona a manutenção do contato sináptico), aumento de CREB-*cAMP response-element-binding* (fator de transcrição que medeia diversas ações na expressão gênica), aumento de GAP-43 - *growth-associated protein* (proteína importante no crescimento neuronal e na liberação de neurotransmissores), aumento dos receptores Trk e do próprio BDNF. Esses fatos sugerem que, em especial o BDNF, tem um papel crucial na plasticidade dependente de experiência (McAllister *et al.*, 1999; Scarisbrick *et al.*, 1999) e que o treinamento físico é um modificador marcante da transmissão sináptica e excitabilidade neuronal (Kafitz *et al.*, 1999; Lu & Fifurov, 1997).

Outros estudos mostram que o exercício físico proporciona aumento da regeneração axonal de neurônios do gânglio da raiz dorsal na medula espinhal e do nervo ciático após lesão (Xing-Yun *et al.*, 2008) através da expressão de BDNF e NT-3 (Molteni, 2004). Da mesma forma, Ying *et al.*, (2008)

demonstraram que o exercício voluntário pode manter os níveis de neurotrofinas e melhorar a recuperação da performance motora mesmo após a lesão de medula espinhal em ratos.

Poucos estudos, no entanto, têm avaliado os efeitos do treinamento físico sobre o sistema neuromuscular e os fatores que afetam sua tolerância em modelos experimentais e em pacientes acometidos pela doença de Chagas.

Dessa forma, o Laboratório Professora Conceição Machado tem abordado os efeitos do treinamento físico sobre a expressão de fatores neurotróficos no modelo experimental de tripanosomíase americana. Resultados anteriores do laboratório demonstraram a maior expressão de NGF e de GDNF no coração de ratos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* em relação aos animais controles, apontando para papel importante do NGF na regeneração de terminações nervosas autonômicas cardíacas na fase aguda da infecção (Martinelli *et al.*, 2006).

Tendo em vista o exposto, consideramos relevante o estudo dos efeitos do exercício físico sobre a lesão e regeneração do sistema neuromuscular de ratos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Além disso, trabalhos prévios do laboratório demonstraram que ratos, da linhagem Holtzman, representam um modelo adequado para estudar as alterações cardíacas induzidas pelo *T. cruzi* na fase aguda da infecção (Camargos *et al.*, 2000).

Neste projeto, a modalidade de exercício escolhida é a corrida em esteira, amplamente utilizada na literatura para estudos fisiológicos, comportamentais e bioquímicos relacionados. Além de ser adequada para ratos, à corrida em esteira permite a mensuração precisa da quantidade de trabalho realizada pelo animal, porque o investigador tem controle sobre a intensidade e duração do exercício. A escolha da esteira e os cuidados com os animais considerarão os parâmetros estabelecidos pela *American Physiological Society* para este tipo de protocolo experimental (Kregel, 2006).

Consideramos importante destacar que nosso protocolo de exercício físico diferencia-se da literatura corrente, pela avaliação do desempenho aeróbico dos animais antes do início do programa de exercício físico na esteira.

Esta metodologia permite classificar os animais controles sedentários e os animais submetidos ao exercício físico de acordo com sua aptidão para o

exercício. Após essa avaliação aeróbica, os animais submetidos à corrida em esteira, o fizeram na velocidade correspondente a 60% de seu desempenho máximo, o que equivale a um exercício físico moderado, conforme protocolo estabelecido pelo Prof. Cândido Celso Coimbra, colaborador deste projeto. Com isso, poderemos, oportunamente, discernir a influência de fatores genéticos e ambientais sobre a plasticidade neuronal e/ou muscular.

## **2 OBJETIVOS**

## 2 Objetivos

Pretende-se analisar o efeito do treinamento físico sobre o parasitismo, inflamação, produção de fatores neurotróficos e citocinas por órgãos do sistema neuromuscular em ratos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

### 2.1 Objetivos específicos

Pretende-se avaliar, em animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, previamente submetidos ou não a treinamento em esteira, os seguintes parâmetros:

- I. curva parasitêmica;
- II. intensidade do parasitismo e processo inflamatório em músculo esquelético e em medula espinhal;
- III. níveis séricos e teciduais de BDNF e NGF;
- IV. níveis séricos e teciduais de citocinas, em especial TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10.

### **3 METODOLOGIA**

### 3 Materiais e Métodos

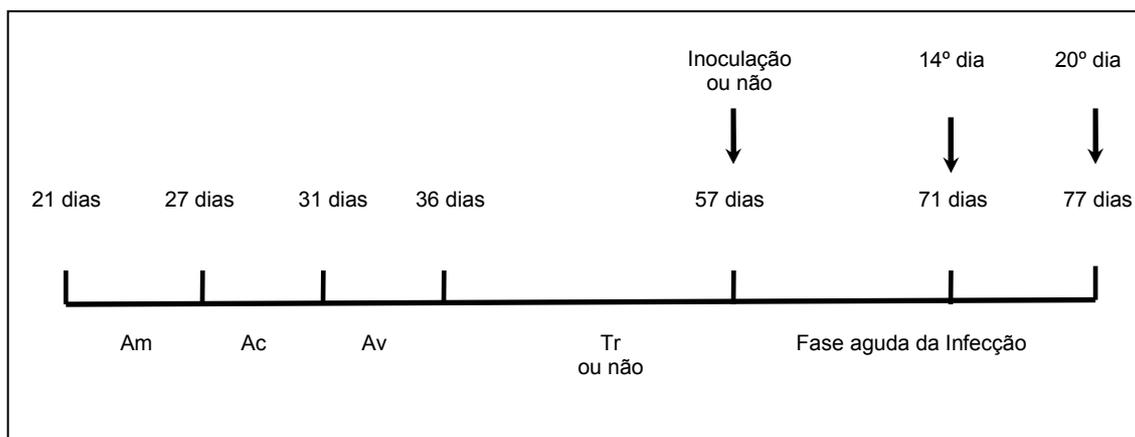
#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman machos jovens (n=46), com 21 dias de idade e peso corporal médio de  $51,64 \pm 9,97$  g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Os animais foram mantidos em estantes climatizadas (Alesco) no Biotério do Departamento de Morfologia, com temperatura constante de 22°C, sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e água e ração *ad libitum*.

Aos 57 dias de idade, os animais foram separados em grupo controle e grupo a serem inoculados com a cepa Y de *T. cruzi*. Nesta idade, apresentaram peso médio de  $213,49 \pm 24,22$  g.

#### 3.2 Delineamento experimental

A Fig.1 sintetiza o delineamento experimental adotado neste trabalho.



**Figura 1.** Ratos com 21 dias de idade foram sequencialmente submetidos a ambientação ao biotério (Am), aclimação em esteira (Ac), avaliação do desempenho físico (Av) e treinamento em esteira (Tr). Ao 57º dia de idade, foram inoculados com cepa Y de *T. cruzi* e sacrificados aos 14º ou 20º dia após a infecção.

Estabeleceram-se, a partir deste delineamento, os grupos experimentais utilizados: controle não treinado (n=12), controle treinado (n=12), infectado treinado (n=11) e infectado não treinado (n=11). Nos dois grupos controles, seis animais foram sacrificados aos 71 dias de idade e seis aos 77 dias. Nos dois grupos infectados, seis animais foram sacrificados aos 71 dias

de idade e cinco aos 77 dias. Todos os animais foram pesados semanalmente (balança Precision Pr 300).

Os procedimentos experimentais executados neste trabalho foram aprovados pelo CETEA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMG, sob protocolo nº 096/2007.

### **3.3 Ambientação e aclimação à corrida em esteira**

Aos 21 dias de idade, os animais foram expostos durante cinco dias consecutivos à esteira elétrica (marca Gaustec Magnetismo) desligada, por 5 minutos, para adaptação a esta atividade. Após este período, durante mais 5 dias consecutivos a esteira era ligada e a velocidade aumentada gradualmente até atingir 10 m/min. Nesta velocidade, os animais correram por cinco minutos, em inclinação de 15°.

### **3.4 Avaliação do desempenho físico**

A avaliação do desempenho físico individual foi realizada de acordo com protocolo de Brooks e White modificado por Hussein, 1978. A avaliação consistiu em três sessões de treinamento em esteira, em dias alternados, com velocidade inicial de 10 m/min em inclinação de 15°. A cada 3 minutos, a velocidade era aumentada em 1 m/min até a fadiga do animal, determinada pela permanência do mesmo na grade, sem correr durante dez segundos consecutivos, ou por três períodos consecutivos de dois segundos em intervalo de um minuto. O tempo e a velocidade final do teste foram registrados para o cálculo do trabalho realizado, estimado de acordo com a seguinte fórmula:

$$W = p \cdot t \cdot v \cdot \text{sen } 15^\circ$$

Onde, W= trabalho em joules; p= peso corporal na última sessão de avaliação, em Kg; t= tempo em minutos; v= velocidade em m/min; sen= seno da inclinação da esteira em graus.

Animais que apresentaram perda de peso, lesões na pele, alopecia, foram excluídos dos grupos experimentais. Aqueles animais que permaneceram estáticos na esteira durante a avaliação do desempenho físico foram agregados nos dois grupos não submetidos a treinamento.

### **3.5 Treinamento Físico**

O treinamento físico consistiu em corrida na esteira elétrica por trinta minutos ao dia, durante vinte e um dias consecutivos, em velocidade fixa correspondente a 60% da média da velocidade máxima obtida nos três dias de avaliação do desempenho físico. A velocidade de treinamento variou de 10m/min a 18m/min.

Os animais não treinados foram expostos ao mesmo ambiente, com esteira desligada, pelo mesmo período de tempo.

### **3.6 Infecção com *Trypanosoma cruzi***

Os animais foram inoculados por injeção intraperitoneal de 300.000 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Esta cepa é mantida em camundongos, por repique semanal, no Laboratório de Biologia dos Tripanosomatídeos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, sob coordenação do Prof. Egler Chiari. Para inoculação dos animais, contamos com a colaboração do técnico Afonso da Costa Viana.

### **3.7 Parasitemia**

A curva parasitêmica foi obtida pelo método descrito por Brener (1962). Após secção da extremidade da cauda dos animais, 5 µl de sangue foram coletados, transferidos para uma lâmina de vidro e cobertos com lamínula de vidro (22x22mm). Os tripomastigotas vivos foram contados em 100 campos da lâmina, em aumento de 400x. O número total de tripomastigotas obtido nos 100 campos foi, então, multiplicado por um fator de correção, resultante do quociente entre o número de campos da lamínula e o número de campos observados. A curva parasitêmica foi obtida a partir dos valores médios diários, obtidos entre o 5° e o 12° dias de infecção.

### **3.8 Sacrifício dos animais**

Os animais foram anestesiados por administração intraperitoneal de solução salina de 2,2,2 tribromoetanol (2,5% em solução salina estéril) no volume de 1ml/100g de peso corporal do animal. Após sacrifício, foram colhidas amostras de sangue, assim como fragmentos da medula espinhal lombar e do nervo ciático esquerdo, segundo protocolo Rigaud *et al.*, (2008), e

de músculo sóleo direito e esquerdo, para processamento conforme a técnica a ser utilizada.

Para obtenção do soro, sangue periférico foi coletado em tubo Vacutainer (marca BD) e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, as amostras foram transferidas para geladeira, a 4°C, por 30 min. Após centrifugação (centrífuga Jouan) a 1600 rotações por minuto (rpm), à temperatura de 4°C, por 10 minutos, o soro foi separado em alíquotas e estocado a -70°C.

### **3.9 Homogeneização de tecidos**

Fragmentos distais da região lombar da medula espinhal, fragmentos de nervo ciático e de músculo sóleo direitos, de 5-6 animais de cada grupo foram congelados em gelo seco e estocados a -70°C para posterior dosagem de proteínas por ELISA. A homogeneização dos fragmentos de tecidos foi realizada de acordo com Bennett *et al.* (1999). As amostras da região lombar da medula espinhal, nervo ciático e sóleo foram imersas em 600 µl de tampão de lise contendo inibidores enzimáticos (TRIS-HCl 20 mM – pH 8, NaCl 137mM, NP40 1%, Glicerol 10%, Aprotinina A 1mM, Pepstatina A 1mM, EDTA 10mM, E-64 10 mM, Ortovanadato de sódio 0,5 mM) e mantidas no gelo. As amostras foram trituradas em sonicador (Ultrasonic Processor) por dez segundos, na amplitude de 60 Hz mantendo-se o recipiente em gelo. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 20 minutos à temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e novamente estocados a -70°C.

### **3.10 Técnicas Histológicas e Histométricas**

Fragmentos centrais da região lombar da medula espinhal e do músculo sóleo esquerdo, de 4-5 animais de cada grupo foram colhidas e imersas em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por uma noite, a 4°C. Em seguida, o material foi desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast (Sigma). Secções transversais da região lombar da medula espinhal e longitudinais de sóleo, com 4µm de espessura, foram obtidas em micrótomo Reichert Jung Autocut 1020 coradas com hematoxilina-eosina. Após a montagem com lamínula e bálsamo

do Canadá. O software Axio Vision 4.7.2 da Zeiss acoplado ao microscópio Axioplan-2 Zeiss foi utilizado para documentação fotográfica.

Para a análise histométrica, utilizaram-se duas secções histológicas do músculo sóleo por animal coradas com hematoxilina-eosina. As proporções volumétrica dos seguintes parâmetros ou componentes teciduais foram analisadas: miônio, estroma normal, inclusive vasos sanguíneos, infiltrado de células inflamatórias e ninho de amastigotas. Utilizou-se ocular integrada kpl (Zeiss, Oberkohen) com 100 pontos e objetiva de 40 X. Foram quantificados os componentes teciduais coincidentes com cada um dos pontos em cada campo, totalizando 50 campos ou 5000 pontos por animal.

### **3.11 Dosagem de BDNF e NGF por ELISA**

Os níveis séricos e teciduais de BDNF e NGF foram obtidos pelo método ELISA sanduíche, utilizando-se Kits e protocolos da “R&D Systems”

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura na concentração de 2µg/ml (BDNF) e 0,4 µg/ml (NGF), diluído em PBS estéril, por uma noite, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e incubadas com solução diluente PBS/BSA 1% (BDNF) ou PBS/BSA 1% mais sacarose 5% em PBS (NGF) para bloqueio de sítios inespecíficos durante uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram incubadas com as amostras de tecidos em duplicata previamente homogeneizadas e diluídas. Para cada placa, obteve-se curva de calibração de proteína quantificada. Poços contendo somente tampão diluente foram adicionados para controle da técnica. A incubação foi por duas horas em temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20. O anticorpo de detecção biotilado foi então diluído, na concentração de 25ng/ml (BDNF) e 100 ng/ml (NGF) em PBS/BSA 1% adicionados nos poços para incubação por duas horas em temperatura ambiente. Repetida a lavagem, foi adicionada estreptavidina conjugada à peroxidase 1:200 (a partir de solução fornecida pelo Kit), durante 20 minutos, sob a proteção da luz e lavado novamente. Para a revelação foi adicionado substrato para a peroxidase durante 20 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Em seguida, fez-se a leitura dos resultados no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices), com comprimento de onda de

450 nm. Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1.

### **3.12 Dosagem de citocinas por ELISA**

Os níveis séricos e teciduais de TNF $\alpha$ , IL-10 e IFN $\gamma$  foram obtidos pelo método ELISA sanduíche, utilizando-se Kits e protocolos da Pharmingen (San Diego, USA). Os poços foram cobertos com anticorpo de captura (diluição de 1:250) em tampão carbonato ou tampão fosfato, de acordo com cada protocolo utilizado e deixados a 4°C por uma noite. Após lavagem com PBS contendo Tween 20 a 0,05%, foram incubados por uma hora com tampão de diluição (PBS e soro fetal bovino a 10%) para bloqueio de sítios inespecíficos. Em cada placa, poços com diferentes diluições da citocina a ser dosada foram usados para a curva padrão. A incubação foi feita à temperatura ambiente por 2 horas. Após lavagem, o anticorpo de detecção (1:250 ou 1:500 em tampão diluição) foi incubado por uma hora à temperatura ambiente. Logo após, foi adicionada estreptavidina conjugada à peroxidase, na diluição de 1:250 em tampão diluição e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se novamente e incubou-se com substrato (Tetrametilbenzidina - TMB) por 30 minutos no escuro para revelação da atividade peroxidásica. A reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e logo a seguir foi a leitura dos resultados no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices), com comprimento de onda de 450 nm. Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1.

### **3.13 Quantificação de proteína total**

A quantificação de proteína total foi determinada de acordo com método de Bradford (1976) em que as amostras de tecidos homogeneizadas foram diluídas, distribuídas em duplicata em placas de 96 poços, e solução de Azul Cromassie G-250 foi acrescentada. Após incubação por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente e sob proteção da luz, a leitura dos resultados foi realizada no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices), com comprimento de onda de 600 nm. Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1.

### **3.14 Análise Estatística**

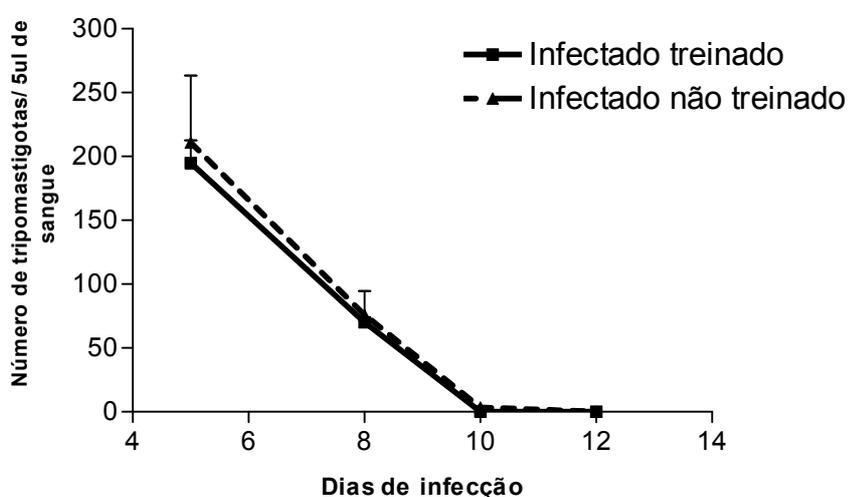
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão, exceto os dados referentes à análise histométrica, que foram expressos utilizando mediana. Para a comparação entre os grupos foi utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney nos dados referentes à parasitemia e análise histométrica ou o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para análise de variância dos dados de peso corporal e ELISA. Foram consideradas significativas as diferenças quando  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas através do software GraphPad Prism, versão 3.0.

## **4 RESULTADOS**

## 4 Resultados

### 4.1 Parasitemia

A curva parasitêmica dos animais infectados treinados e não treinados estendeu-se entre o 5º e o 10º dia de infecção. A parasitemia mostrou-se baixa e de curta duração, com valores máximos de 263 tripomastigotas/5µl de sangue. Ambos os grupos experimentais, treinados e não treinados, mostraram valores semelhantes de parasitemia (Fig.2).

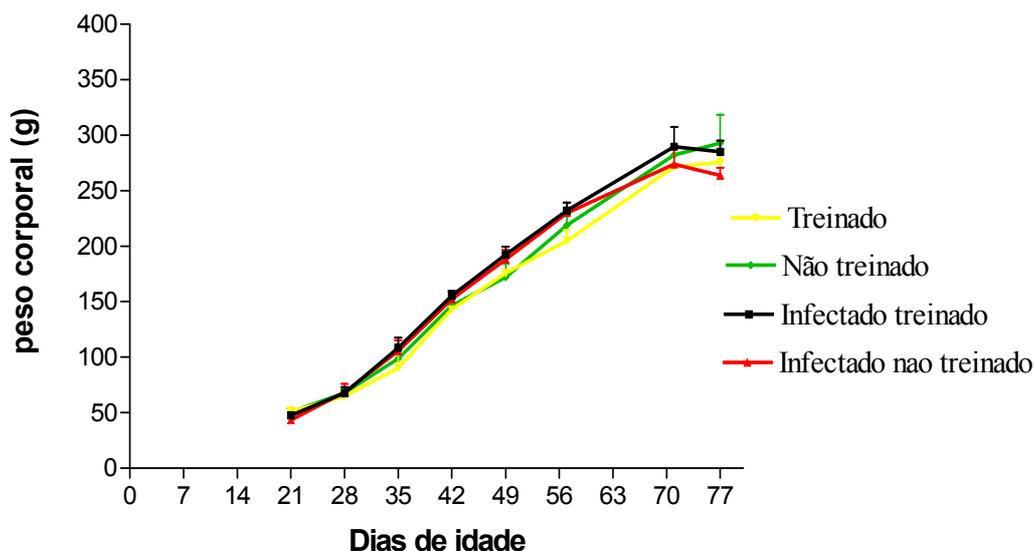


F

**Figura 2** Valores médios diários de parasitemia de ratos inoculados aos 57 dias de idade com 300.000 tripomastigotas de cepa Y de *T. cruzi* submetidos (n=11) ou não (n=11) a treinamento prévio em esteira por três semanas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Mann-Whitney.  $p > 0,05$ .

### 4.2 Peso Corporal

Os animais controles e infectados apresentaram ganho de peso corporal semelhante, independentemente de terem sido submetidos ou não a treinamento físico em esteira (Fig 3)



**Figura 3** Peso corporal médio de ratos infectados aos 57 dias de idade com a cepa Y de *T. cruzi* submetidos (n=11) ou não (n=11) a treinamento prévio em esteira por três semanas e seus respectivos controles treinados (n=12) e não treinados (n=12). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ .

### 4.3 Análises Histológica e Histométrica

#### 4.3.1 Medula Espinhal

A região lombar da medula espinhal de animais com 14 dias de infecção mostrou-se histologicamente semelhante à medula de animais controles, sem processos inflamatórios perivasculares ou no parênquima do órgão. Ademais, não se observou alterações na pia-máter, frequentemente visível nas secções histológicas. Já aos 20 dias de infecção, observaram-se processos inflamatórios leves na substância branca, em sua maioria localizados abaixo da pia-máter e na substância cinzenta. Em três dos animais infectados treinados e em dois dos animais infectados não treinados, as alterações resultantes da infecção com *T. cruzi* foram mais significativas. Nestes animais, observaram-se nódulos glioinflamatórios na substância cinzenta e na periferia da substância branca, assim como processo inflamatório perivascular. Em um dos três animais infectados e não treinados, estas alterações foram mais acentuadas ainda, destacando-se o intenso parasitismo de células gliais (Fig 5). Na pia-máter destacou-se a presença de processos inflamatórios perivasculares.

#### 4.3.2 Músculo Sóleo

Aos 14 dias de infecção, o processo inflamatório foi em sua maior parte, discreto a moderado, predominantemente mononuclear, localizado entre os miôníos e em posição perivascular no tecido conjuntivo do perimísio. Processo inflamatório com células polimorfonucleares e monucleares eram, às vezes, observados no interior das fibras musculares. Ninhos de amastigotas esparsos foram também observados neste período de infecção. No entanto, o processo inflamatório era a alteração diferencial deste grupo.

Por sua vez, os animais treinados e aos 14 dias de infecção mostraram, aparentemente, menor intensidade de processo inflamatório entre as fibras musculares. O infiltrado mostrou-se discreto e difuso na maioria dos animais deste grupo. Ninhos de amastigotas não eram freqüentes neste grupo (Fig. 4).

No grupo de animais com 20 dias de infecção, observaram-se intenso e difuso processo inflamatório com predominância de células mononucleares e ninhos de amastigotas eram freqüentes. Imagens típicas de degeneração segmentar das células musculares eram também freqüentes. Neste período da infecção, observaram-se miotubos entre as fibras musculares maduras. (Fig.4). Aparentemente, as alterações observadas nos animais infectados não treinados eram semelhantes à do grupo infectado e treinado.

Aos 14 dias de infecção, os animais treinados apresentaram valores percentuais de infiltrado inflamatório na faixa de 3,06 a 5,82 (mediana=5,14). Já nos animais não treinados, os valores de infiltrado inflamatório foram maiores e variaram de 6,38 a 13,76 (mediana=9,06;  $p=0,007$ ).

Já aos 20 dias, os valores percentuais para este parâmetro foram semelhantes e variaram nos animais não treinados de 15,80 a 29,86 (mediana=19,94) e nos animais treinados de 22,3 a 47,12 (mediana=22,61;  $p>0,05$ ).

Os valores percentuais de ninhos de amastigotas aos 14 e 20 dias de infecção foram semelhantes, variando de 0 a 1,0% (mediana = 0,006) nos animais não treinados.e de 0 a 0,4% (mediana =0) nos animais treinados aos 14 dias e de 0,44 a 2,20% (mediana = 1,22) nos animais treinados.e de 0 a 2,86% (mediana = 1,08) nos animais não treinados aos 20 dias de infecção,  $p>0,05$ .

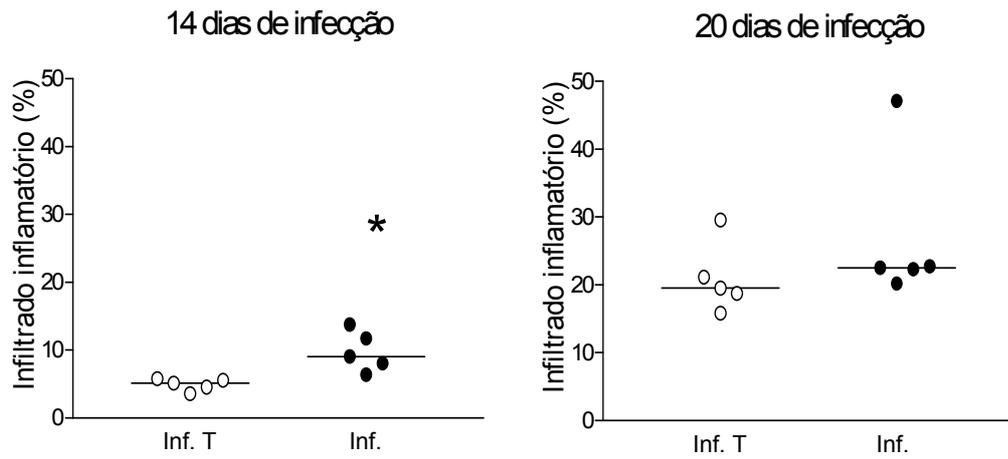
Os valores percentuais de estroma normal e miônio mostraram-se semelhantes em todos os grupos analisados.

A Tabela 1 mostra os parâmetros histológicos avaliados nos animais infectados e seus respectivos controles. Na figura 6, destacamos a proporção volumétrica de amastigotas e de processo inflamatório aos 14 e 20 dias de infecção.

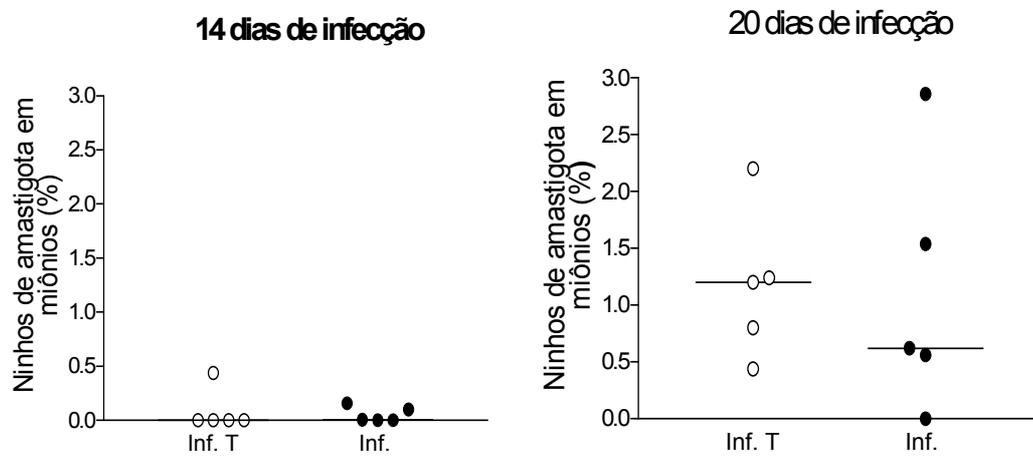
**Tabela 1** Análise histométrica (%) no músculo sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.

Par. Grupo	Miônio (%)			Estroma normal (%)			Infiltrado inflamatório (%)			Ninho de amastigota (%)		
	Min.	Mediana	Max.	Min.	Mediana	Max.	Min.	Mediana	Max.	Min.	Mediana	Max.
Co (14 dias)	77,32	78,02	82,18	17,28	21,98	22,56	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Co (20 dias)	69	75,98	78,12	22,88	22,82	31	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Co T (14 dias)	79,38	81,02	81,44	16,7	18,44	18,56	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Co T (20 dias)	75,4	75,68	79,38	24,32	25	35,44	xx	xx	xx	xx	xx	xx
Inf. T (14 dias)	66,24	71,55	76,1	15,66	19,44	21,74	3,06	5,14	5,82	0	0	0,44
Inf. (20 dias)	38,9	52,54	57,88	15,08	21,32	25,96	15,8	19,94	29,56	0	1,08	2,86
Inf. (14 dias)	71,8	72,7	75,28	16,16	17,15	25,54	6,38	9,06	13,76	0	0,006	0,16
Inf. T (20 dias)	51,36	58,27	64,8	15,36	17,15	25,54	22,3	22,61	47,12	0,44	1,22	2,2

A-



B-

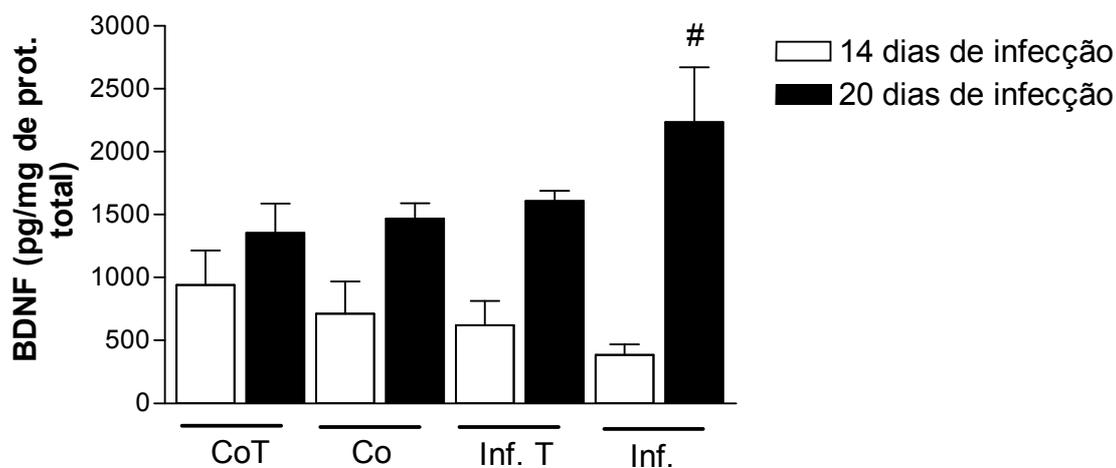


**Figura 6** Proporção volumétrica no músculo sóleo de animais treinados e infectados pela cepa Y de *T. cruzi* dos grupos com 14 e 20 dias de infecção. (A) Infiltrado de células inflamatórias (B) Ninhos de amastigotas (n=5 por grupo) As linhas em cada coluna representam medianas \* indica diferença significativa em relação ao controle com 14 dias de infecção. Mann-Whitney.  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Níveis teciduais e séricos de fatores neurotróficos

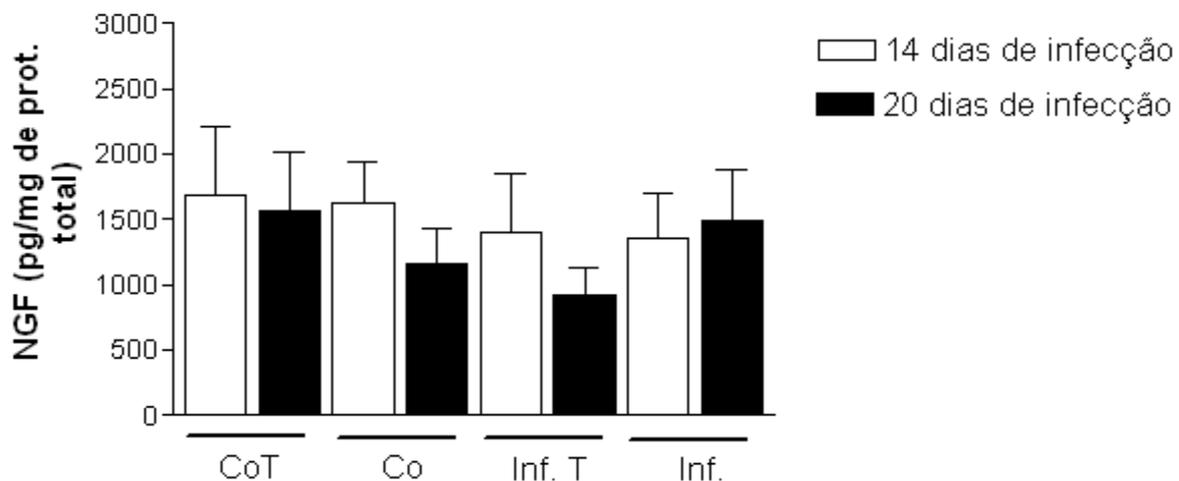
##### 4.4.1 Medula Espinhal

Os níveis de BDNF foram semelhantes nos grupos com 14 e 20 dias de infecção. Pelo contrário, os níveis de BDNF encontraram-se aumentados nos animais infectados no grupo com 20 dias em relação ao grupo com 14 dias de infecção (Fig. 7).



**Figura 7** Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. # indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$  ( $n = 5-6$  por grupo)

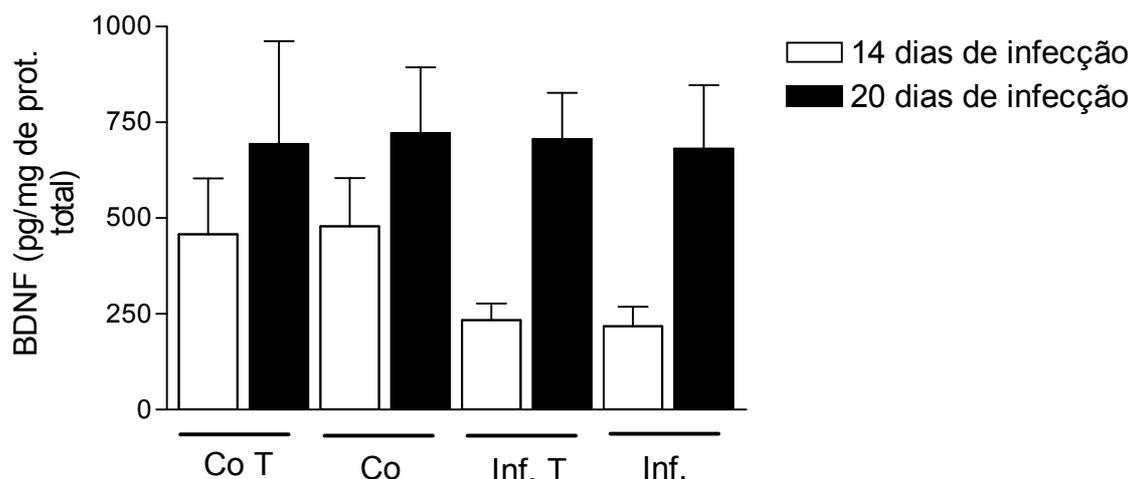
Os valores de NGF mostraram-se semelhantes entre os animais de cada um dos grupos com 14 ou com 20 dias de infecção e seus respectivos controles (Fig. 8).



**Figura 8** Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

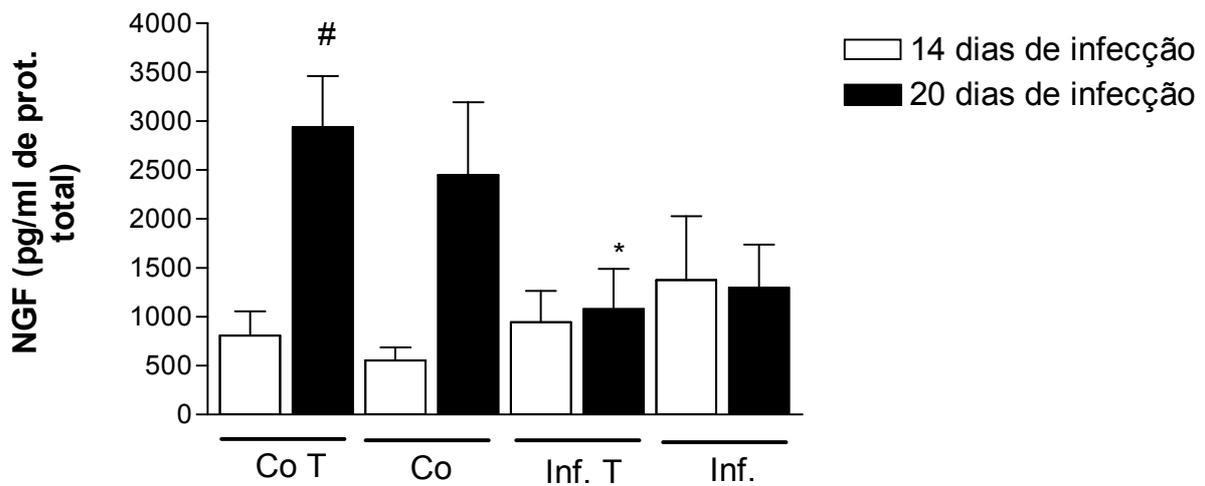
#### 4.4.2 Ciático

Não observamos diferença significativa dos níveis de BDNF nos animais infectados treinados e não treinados com seus respectivos controles nos grupos de 14 dias e 20 dias de infecção (Fig 9).



**Figura 9** Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no ciático de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

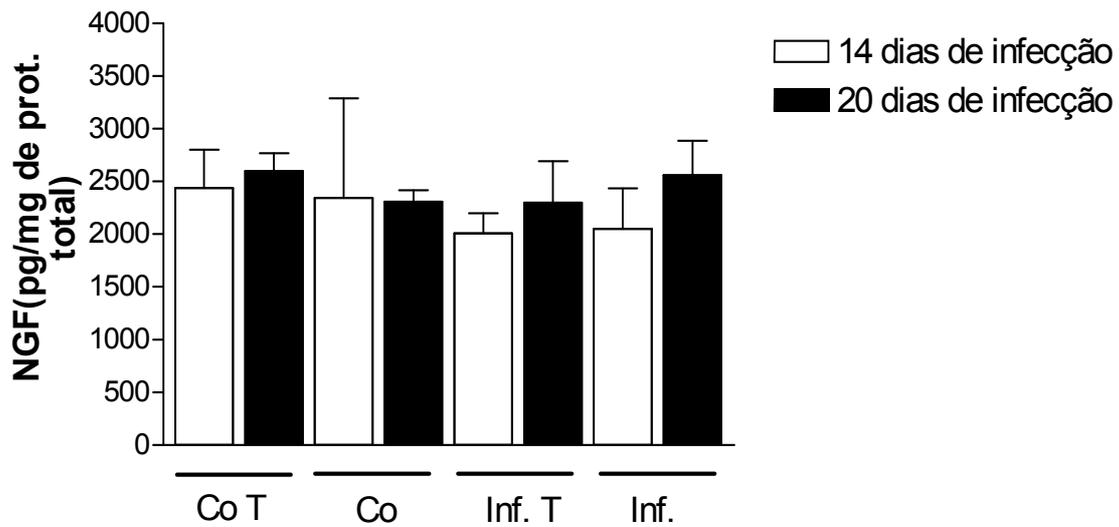
Os níveis de NGF no ciático aos 14 dias de infecção foram semelhantes entre os grupos analisados. Já no grupo com 20 dias de infecção, os animais infectados treinados apresentaram níveis de NGF inferiores aos de seu controle treinado e os animais treinados níveis maiores quando comparados ao grupo com 14 dias de infecção (Fig. 10).



**Figura 10** Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no ciático de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

#### 4.4.3 Músculo Sóleo

Os níveis de BDNF foram indetectáveis em todos os grupos analisados, independentemente de serem infectados ou treinados. Por sua vez, os níveis de NGF mostraram-se semelhantes em todos os grupos analisados (Fig. 11).



**Figura 11** Níveis de NGF (pg/mg de proteína total) no soro de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

#### 4.4.4 Níveis séricos

Em todos os grupos, nos dois períodos de infecção, não houve diferença significativa nos níveis séricos de BDNF (Fig.12).

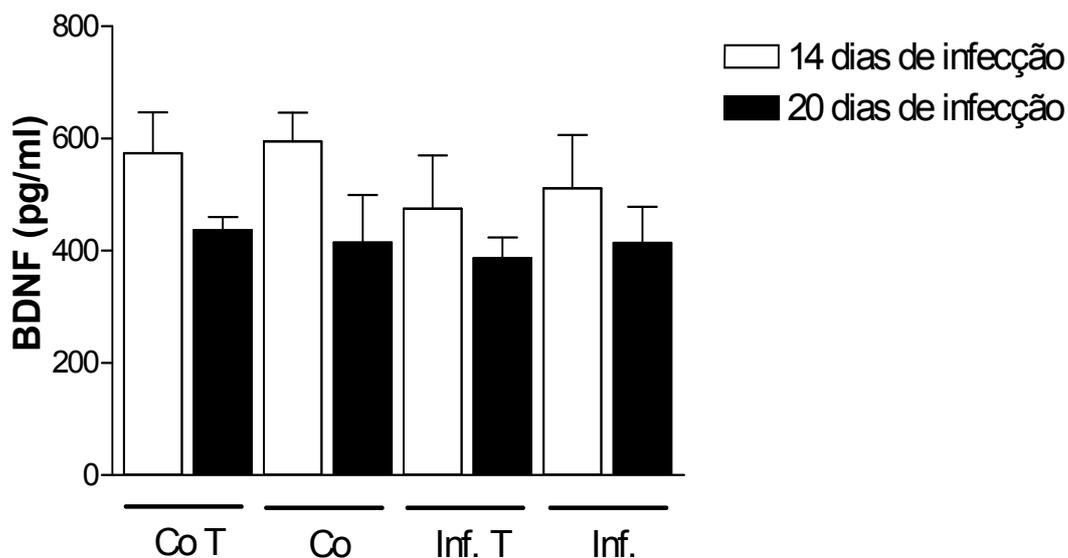


Figura 12 Níveis séricos de BDNF (pg/ml) de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

Com relação ao NGF, aos 14 e 20 dias de infecção, não houve diferença entre os níveis séricos de animais infectados, treinados e não treinados. No entanto, observamos aumento destes níveis nos animais controles treinados aos 14 dias em relação aos 20 dias de infecção (Fig.13).

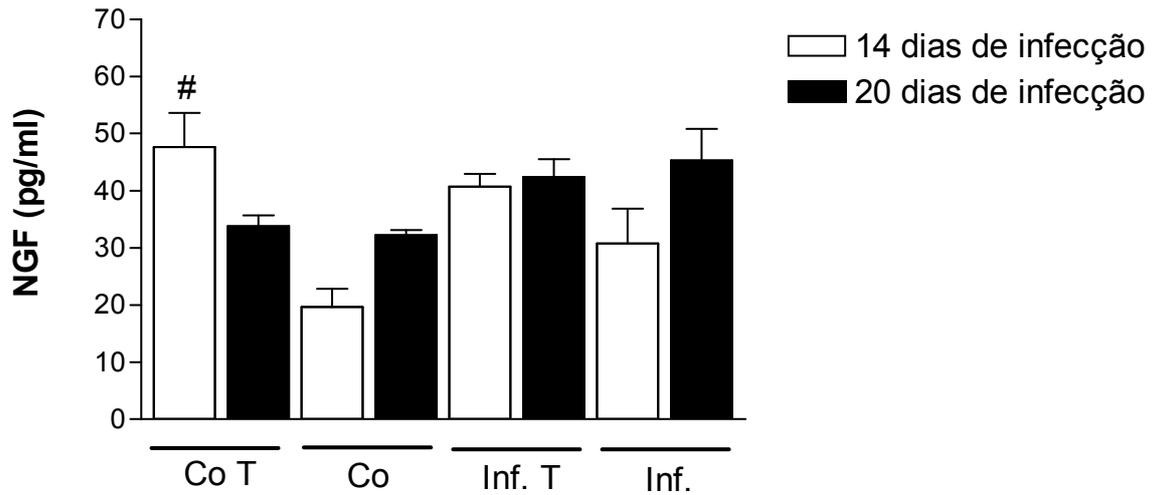
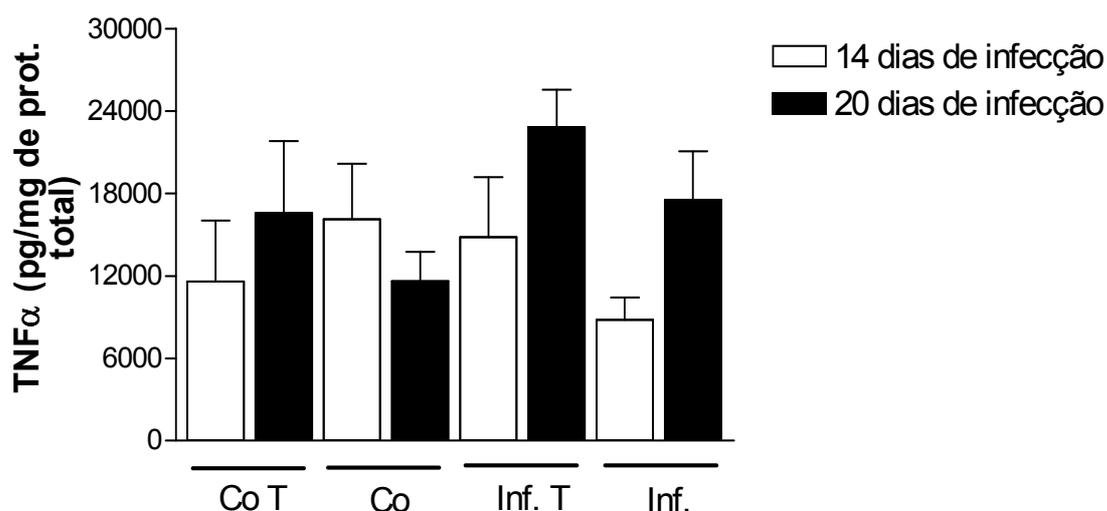


Figura 13 Níveis séricos de NGF (pg/ml) de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. # indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

#### 4.5 Níveis teciduais de citocinas

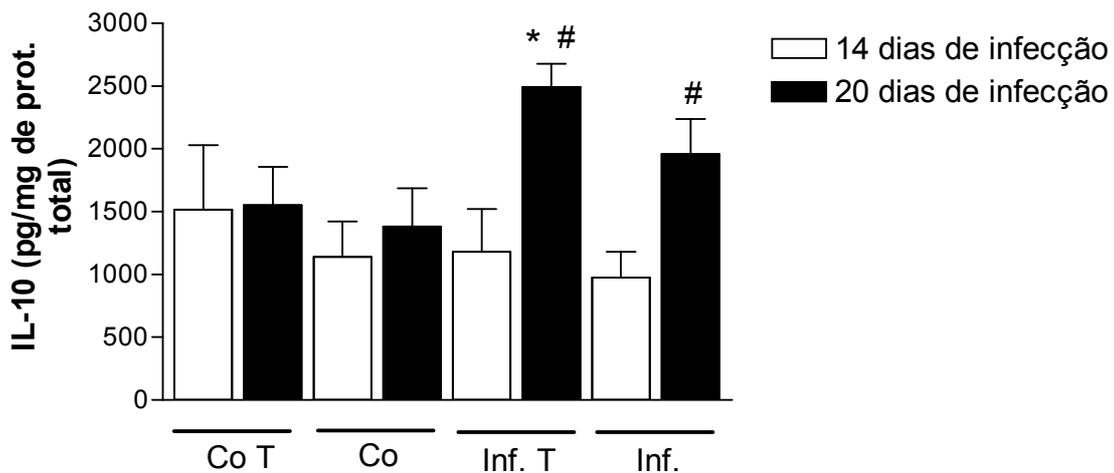
##### 4.5.1 Medula espinhal

Os valores de TNF $\alpha$  encontrados na medula espinhal no grupo com 14 e 20 dias de infecção não apresentaram diferença significativa quando comparados a seus respectivos controles, bem como quando comparados com os animais infectados treinados e não treinados (Fig. 14).



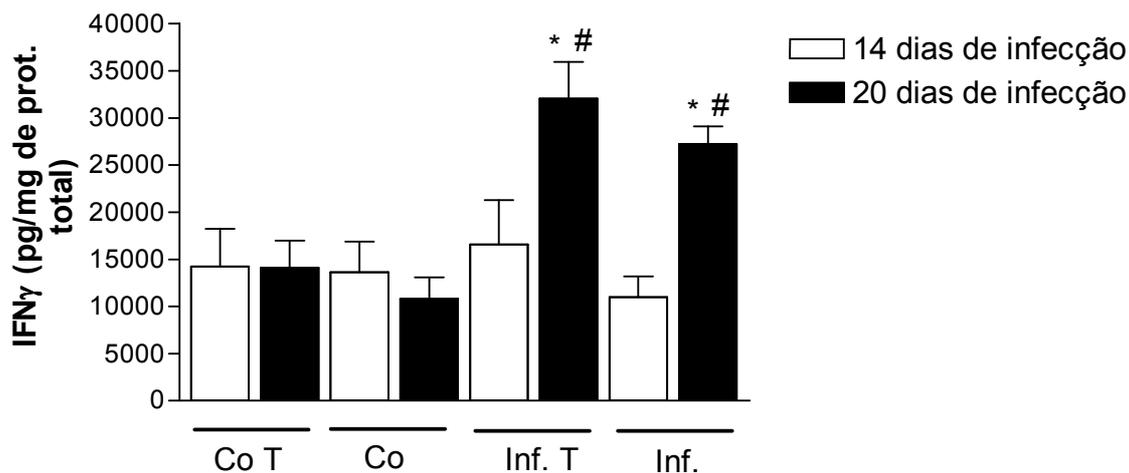
**Figura 14** Níveis de TNF $\alpha$  (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

Aos 14 dias de infecção, os níveis medulares de IL-10 mostraram-se semelhantes em todos os grupos analisados. Por outro lado, aos 20 dias de infecção, o treinamento resultou no aumento da expressão dos níveis de IL-10 em relação ao seu controle treinado. Além disso, os animais infectados treinados e não treinados do grupo com 20 dias de infecção apresentaram níveis maiores de IL-10 quando comparados aos mesmos do grupo com 14 dias de infecção (Fig.15).



**Figura 15** Níveis de IL-10 (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

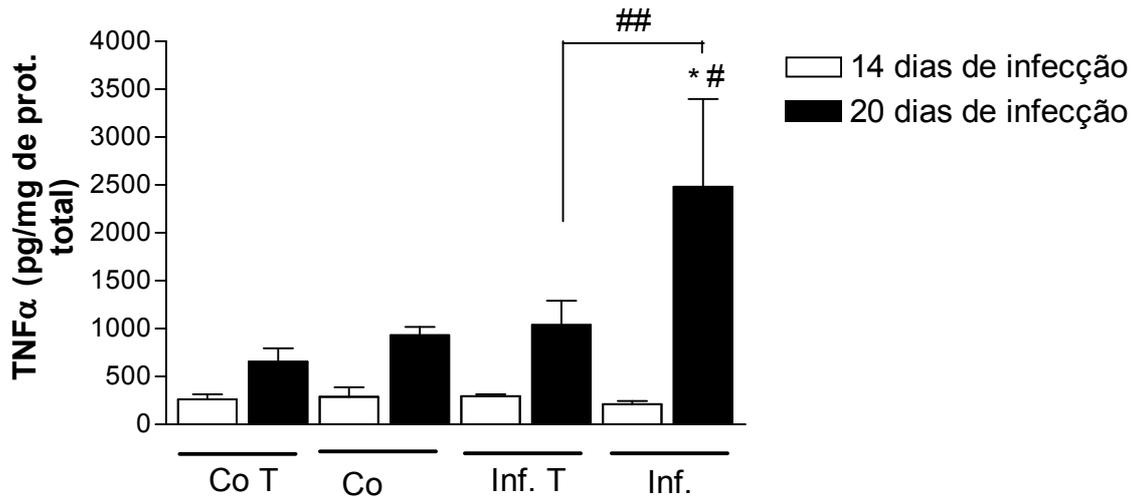
Os valores de IFN $\gamma$  na medula espinhal dos animais do grupo com 14 dias de infecção apresentaram valores semelhantes. Por outro lado, os animais treinados e não treinados no grupo com 20 dias de infecção apresentaram níveis aumentados quando comparados a seus controles e superiores quando comparados ao grupo com 14 dias de infecção. Os níveis de IFN $\gamma$  nos infectados treinados e não treinados não foram diferentes (Fig. 16).



**Figura 16** Níveis de IFN $\gamma$  (pg/mg de proteína total) na região lombar da medula espinhal de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

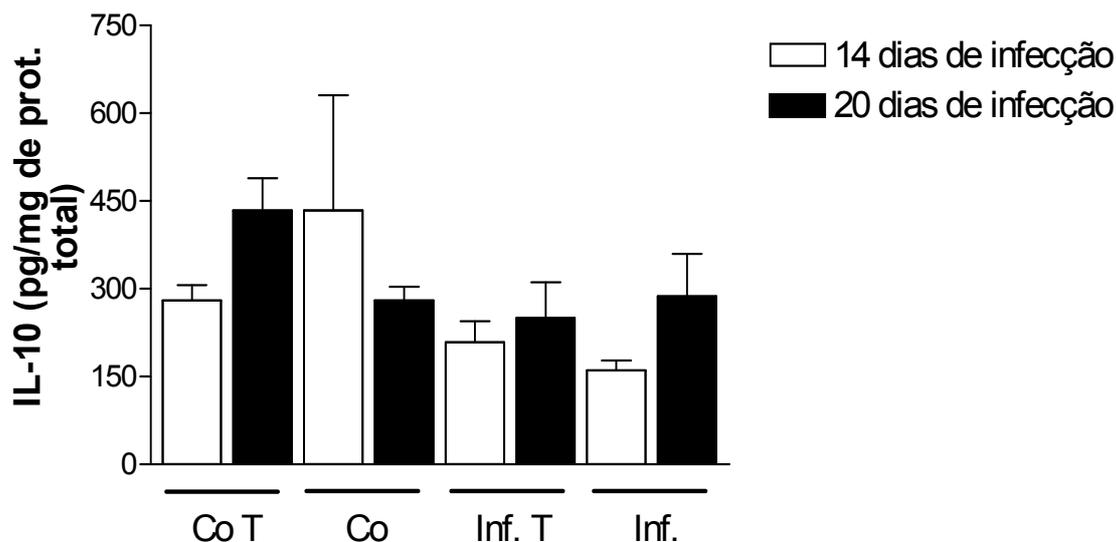
#### 4.5.2 Músculo Sóleo

No grupo com 14 dias de infecção os valores de TNF $\alpha$  foram semelhantes em todos os grupos analisados. Pelo contrário, no 20º dia de infecção os animais infectados apresentaram níveis maiores de TNF $\alpha$  em relação a seus controles e ao grupo com 14 dias de infecção, bem como ao grupo infectado treinado no 20º dia (Fig. 17).



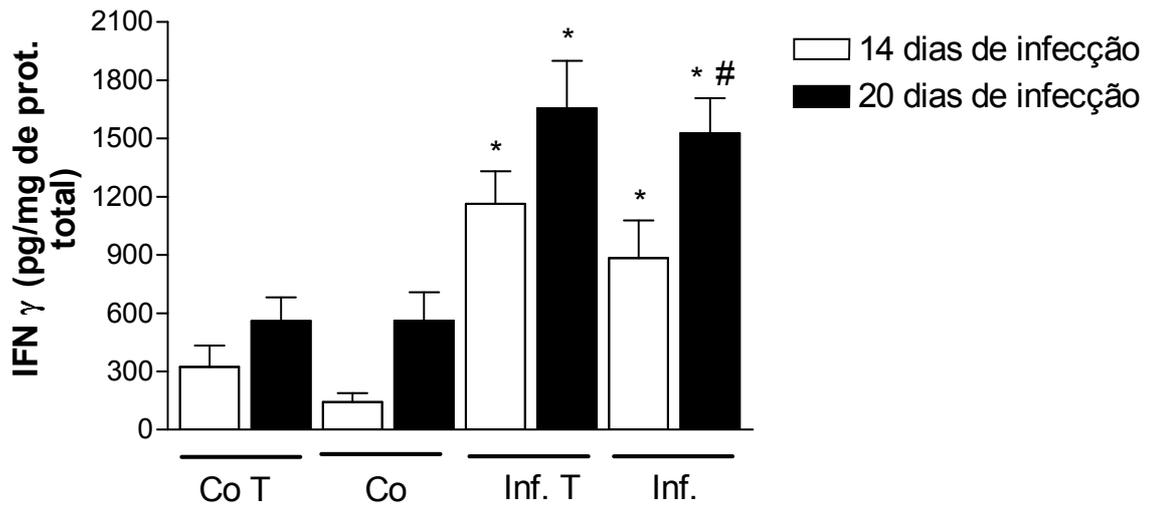
**Figura 17** Níveis de TNF $\alpha$  (pg/mg de proteína total) no sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. ## indica diferença significativa em relação ao grupo infectado treinado. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

Os grupos com 14 e 20 dias de infecção apresentaram valores semelhantes de IL-10 no sóleo em todos os grupos analisados (Fig. 18).



**Figura 18** Níveis de IL-10 (pg/mg de proteína total) no sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$  ( $n=5-6$  por grupo).

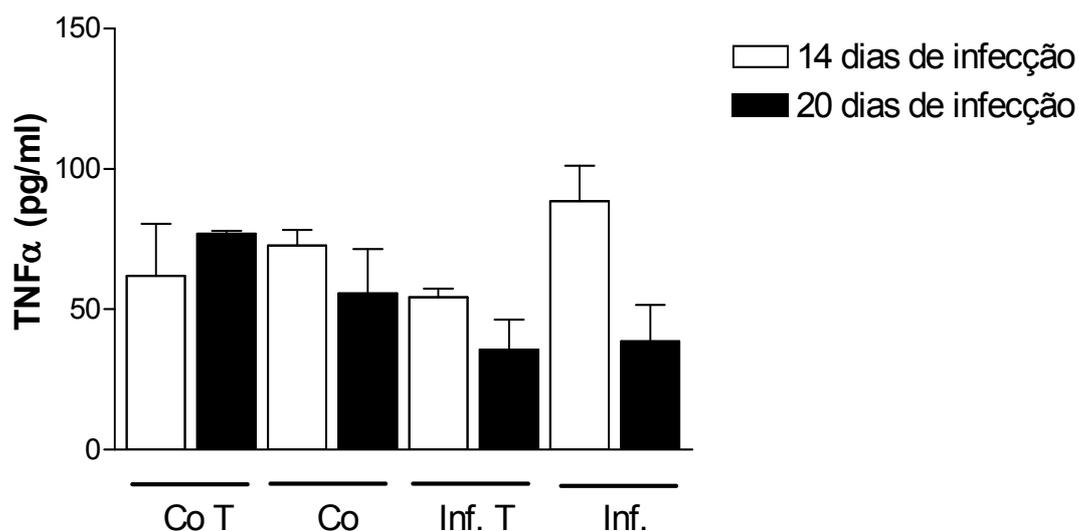
Os níveis de IFN $\gamma$  no sóleo de animais infectados treinados e não treinados encontraram-se aumentados em relação a seus controles no 14º dia de infecção. Não houve diferença estatística quando comparamos infectados treinados e não treinados. No grupo com 20 dias de infecção, os níveis de IFN $\gamma$  dos animais infectados treinados e não treinados permaneceram superiores quando comparados aos seus controles. Da mesma forma, os animais infectados com 20 dias apresentaram níveis de IFN $\gamma$  maiores que o grupo com 14 dias de infecção (Fig.19).



**Figura 19-** Níveis de IFN $\gamma$  (pg/mg de proteína total) no sóleo de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle. # indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

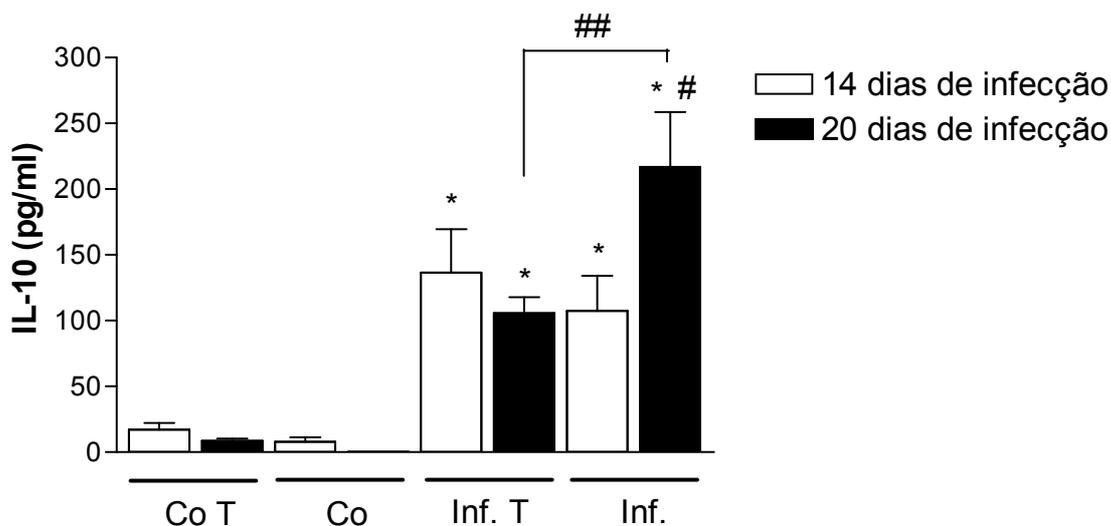
#### 4.5.3 Níveis Séricos

Não houve diferença estatística nos níveis de TNF $\alpha$  entre os animais treinados e não treinados com seus respectivos controles nos grupos, com 14 e 20 dias de infecção (Fig. 20).



**Figura 20** Níveis séricos de TNF $\alpha$  (pg/ml) de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

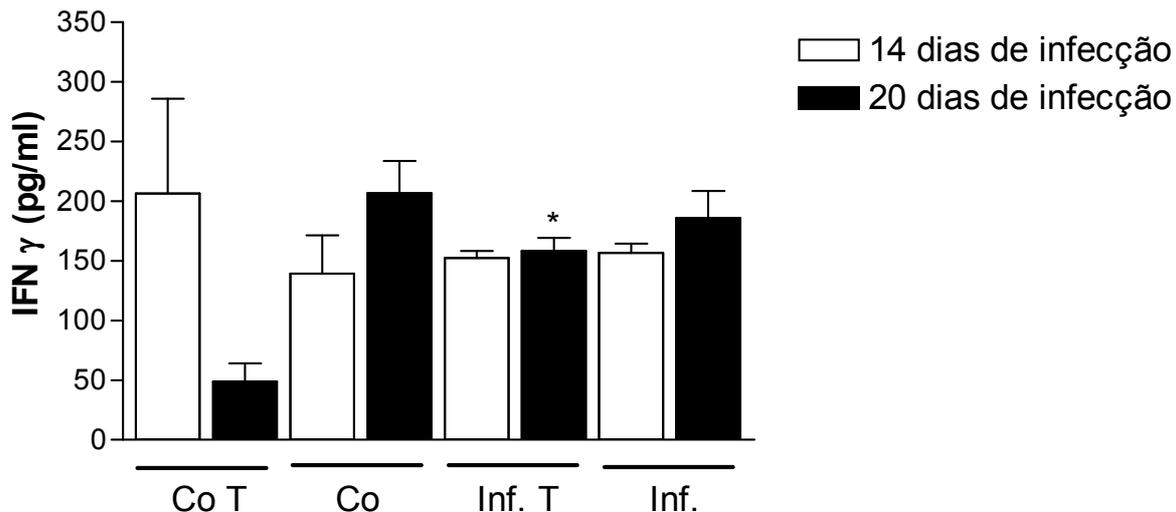
Os animais infectados treinados e não treinados do grupo com sacrifício no 14º dia apresentaram aumento expressivo de IL-10 no soro em relação a seus respectivos controles. Particularmente, os animais infectados treinados e infectados do grupo com 20 dias de infecção apresentaram aumento significativo de IL-10 quando comparado a seus controles. Os infectados não treinados desse grupo tiveram níveis maiores de IL-10 quando comparados ao grupo de 14 dias de infecção e ao grupo de animais infectados treinados com 20 dias (Fig. 21). Os níveis de IL-10 do grupo controle aos 20 dias foram indetectáveis.



**Figura 21** Níveis séricos de IL-10 (pg/ml) de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle. # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. ## indica diferença significativa em relação ao mesmo grupo com 14 dias de infecção. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

No grupo com 14 dias de infecção, todos os animais, exceto os treinados, apresentaram níveis de IFN $\gamma$  de  $150 \pm 8,46$  pg/ml aproximadamente. Do mesmo modo, no grupo com 20 dias de infecção, os animais não treinados e seu controle apresentaram níveis de IFN $\gamma$  de  $200 \pm 16,97$  pg/ml aproximadamente. Os infectados treinados tiveram níveis aumentados de IFN $\gamma$  quando comparados a seu controle. Não houve diferença entre infectados treinados e não treinados (Fig. 22).

O resumo dos resultados encontram-se resumidos na tabela 2:



**Figura 22** Níveis séricos de IFN $\gamma$  (pg/ml) de ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \* indica diferença significativa em relação ao grupo controle. Kruskal-Wallis  $p < 0,05$ . (n=5-6 por grupo).

**Tabela 2** Resumo dos resultados obtidos pela dosagem de fatores neurotróficos e citocinas, por ELISA, em ratos aos 14 e 20 dias de infecção com cepa Y de *T. cruzi*, e seus respectivos controles, submetidos ou não a treinamento em esteira.

Par.	BDNF		NGF		TNF $\alpha$		IL-10		IFN $\gamma$	
	Medula	Ciático	Soro	Sóleo	Medula	Soro	Medula	Sóleo	Medula	Sóleo
Co T (14 dias)			↑							
Co (14 dias)										
Inf. T (14 dias)						↑			↑	
Inf. (14 dias)						↑			↑	
Co T (20 dias)		↑								
Co (20 dias)										
Inf. T (20 dias)		↓			↑	↑	↑	↑	↑	↑
Inf. (20 dias)	↑				↑	↑	↑	↑	↑	↑

Co – Controle; Co T- Controle treinado; Inf – Infectado; Inf T- Infectado Treinado

## FIGURA 4

FOTOMICROGRAFIAS DE SECÇÕES DE SÓLEO DE RATOS ADULTOS COM 14 OU 20 DIAS DE INFECÇÃO COM A CEPA Y DE *T. CRUZI* SUBMETIDOS OU NÃO AO TREINAMENTO FÍSICO EM ESTEIRA POR TRÊS SEMANAS E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES TREINADOS E NÃO TREINADOS.

Coloração hematoxilina-eosina

4A Animal controle aos 57 dias de idade .

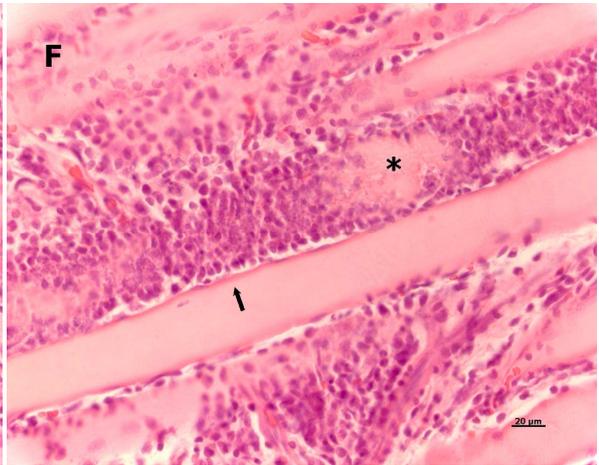
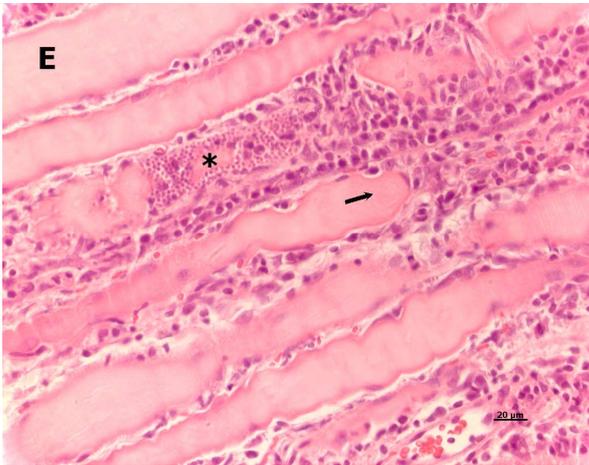
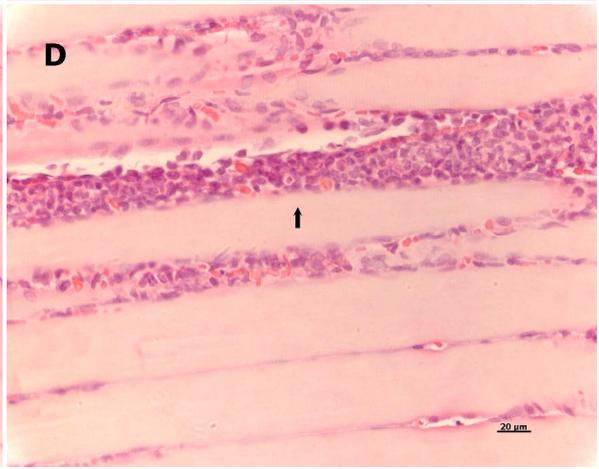
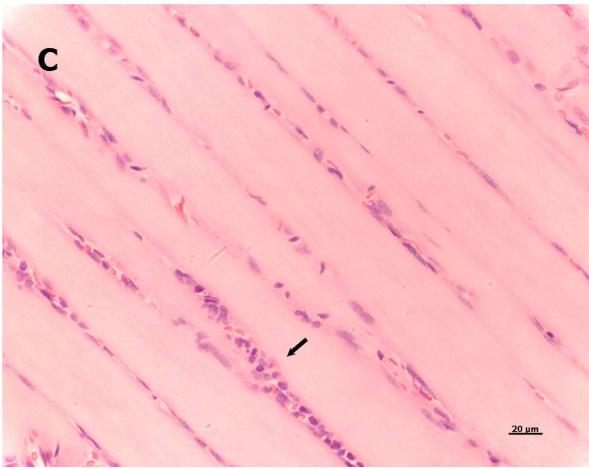
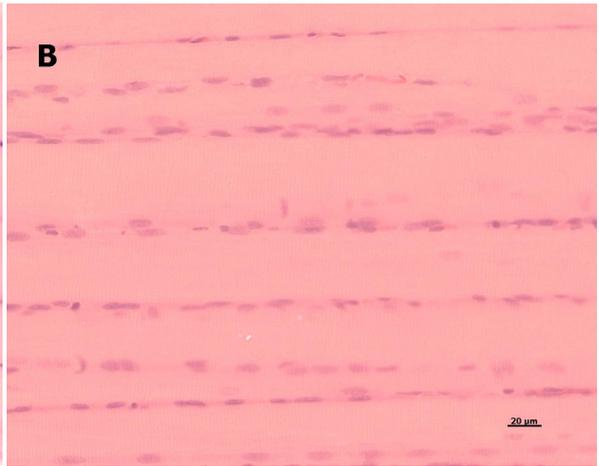
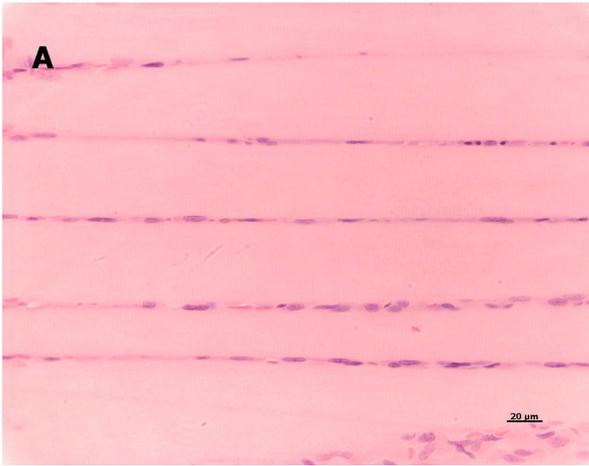
4B Animal controle treinado aos 57 dias de idade

4C Animal treinado aos 14 dias de infecção com menor intensidade do processo inflamatório (seta) .

4D Animal não treinado aos 14 dias de infecção com infiltrado de células inflamatórias entre as fibras musculares (seta) .

4E Animal treinado aos 20 dias de infecção com presença de intenso e difuso processo inflamatório entre as fibras e no interior delas (seta) e sinais de degeneração segmentar das células musculares (asterisco) .

4F Animal não treinado aos 20 dias de infecção com presença de degeneração segmentar das células musculares (asterisco) e intenso e difuso infiltrado inflamatório entre as fibras e no interior delas (asterisco).



## FIGURA 5

FOTOMICROGRAFIAS DE SECÇÕES DA REGIÃO LOMBAR DA MEDULA ESPINHAL DE RATOS ADULTOS COM 14 OU 20 DIAS DE INFECÇÃO COM A CEPA Y DE *T. CRUZI* SUBMETIDOS OU NÃO AO TREINAMENTO FÍSICO EM ESTEIRA POR TRÊS SEMANAS E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES TREINADOS E NÃO TREINADOS.

Coloração hematoxilina-eosina

4A Animal controle aos 57 dias de idade mostrando interseção da substância cinzenta e branca na região do corno anterior da medula espinhal .

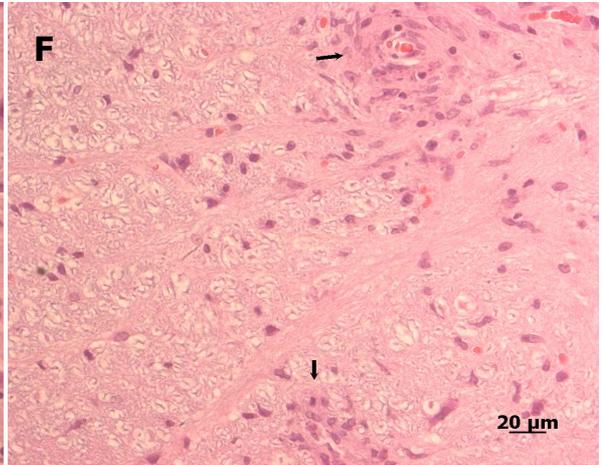
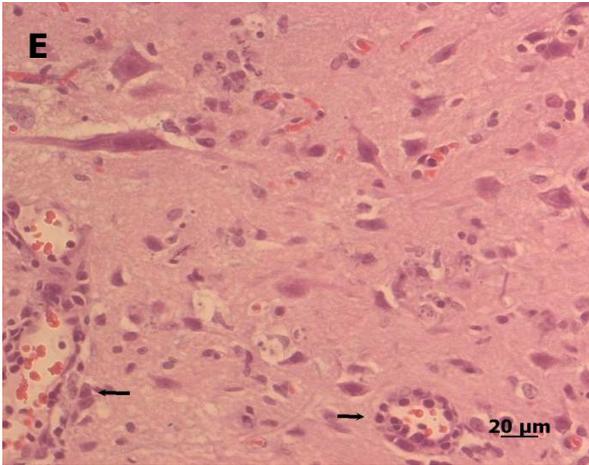
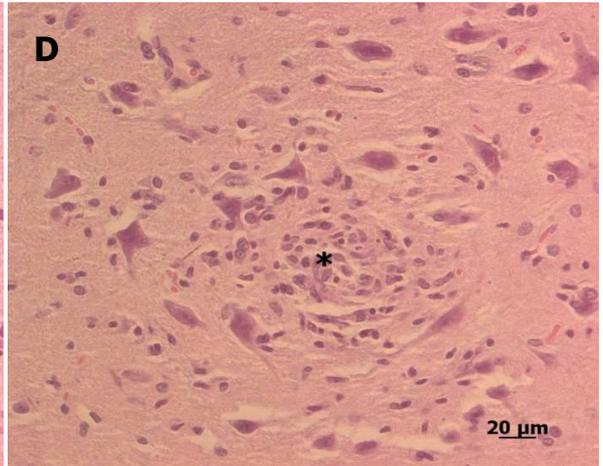
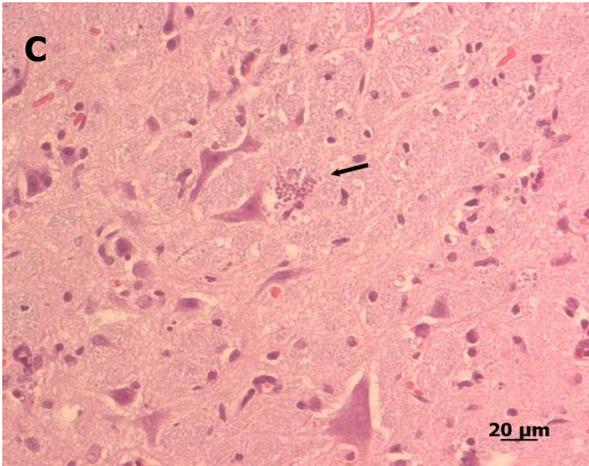
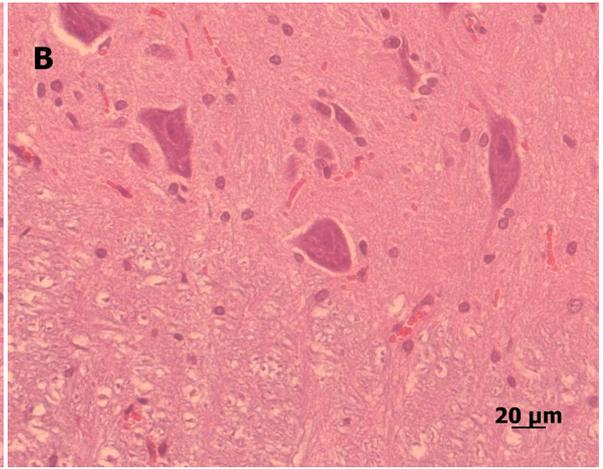
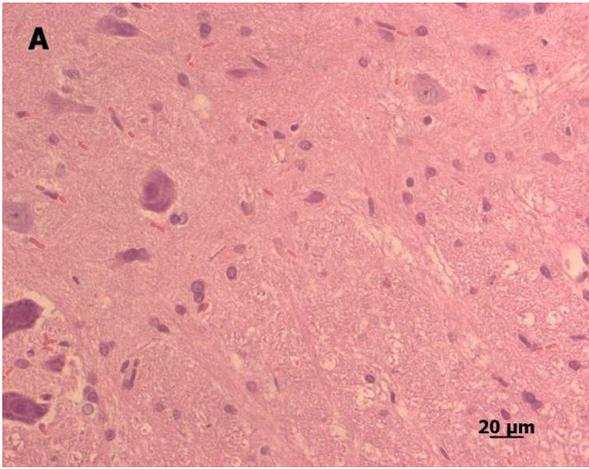
4B Animal controle treinado aos 57 dias de idade mostrando interseção da substância cinzenta e branca na região do corno anterior da medula espinhal .

4C Animal não treinado aos 20 dias de infecção com ninho de amastigota na substância cinzenta da medula espinhal (seta).

4D Animal treinado aos 20 dias de infecção com nódulo glioinflamatório na substância cinzenta da medula espinhal (asterisco).

4E Animal não treinado aos 20 dias de infecção com infiltrado inflamatório perivascular na substância cinzenta da medula espinhal (setas) .

4F Animal não treinado aos 20 dias de infecção com infiltrado inflamatório na substância branca da medula (seta).



## **5 DISCUSSÃO**

## 5 Discussão

Nesta discussão, abordaremos, inicialmente, os aspectos relacionados ao modelo experimental de tripanosomíase americana em ratos e, a seguir, os efeitos do treinamento físico em esteira sobre esta infecção.

Neste estudo utilizamos o inóculo de 300.000 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* para a infecção de ratos com 57 dias de idade. Os valores parasitêmicos mostraram-se baixos, com pico da parasitemia no 5º dia de infecção. No 10º dia, não mais se observavam tripomastigotas no sangue. Esse padrão se manteve tanto para o grupo dos animais treinados quanto para o grupo de animais não treinados, não havendo diferença significativa entre eles.

Anteriormente, resultados do Laboratório de Neurobiologia, já haviam demonstrado que animais adultos infectados com a cepa Y apresentam parasitemia baixa e de curta duração, estendendo-se do 4º ao 8º ou 12º dia de infecção (Guerra *et al.*, 2001). Em conjunto, esses dados contradizem o descrito anteriormente (Kolodny, 1939) sobre a resistência de ratos adultos à infecção experimental com *T. cruzi*. Além disso, estudos do laboratório demonstraram que valores parasitêmicos baixos, em ratos adultos, não refletem as alterações histopatológicas resultantes da infecção, em especial a miocardite e miosite da fase aguda (Guerra *et al.*, 2001; Nagib *et al.*, 2007).

Com relação ao envolvimento de músculos esqueléticos na tripanosomíase americana experimental, resultados prévios do Laboratório de Neurobiologia mostraram que o parasitismo e o processo inflamatório ao longo da fase aguda da infecção experimental com a cepa Y de *T. cruzi* são mais intensos aos 20 dias do que aos 14 dias de infecção. Aos 20 dias, ninhos de amastigotas ocupam extensas porções das fibras musculares. A ruptura destas células é acompanhada de invasão de células inflamatórias e degeneração segmentar das miofibras. Concomitantemente à degeneração muscular, ocorre ativação de células satélites e formação de miotubos, com regeneração segmentar das miofibras (Maldonado *et al.*, 2004).

Nossos resultados corroboram estes dados em animais infectados aos 57 dias de idade e não aos 29 dias como utilizado por Maldonado *et al.*, (2004). Em nosso trabalho observamos parasitismo e processos inflamatórios aos 14 e 20 dias de infecção, mas com maior intensidade aos 20 dias de infecção.

De acordo com Maldonado *et al.*, (2004), o processo inflamatório em músculo esquelético caracteriza-se pela presença de células mononucleares, com predomínio de linfócitos CD8<sup>+</sup>, células NK e macrófagos ED1<sup>+</sup> e ED2<sup>+</sup>, principalmente entre o 12º e 20º dia de infecção. Esse processo inflamatório torna-se reduzido aos 32 dias de infecção.

O envolvimento do sistema nervoso central durante a fase aguda da infecção experimental com diferentes populações de *T. cruzi* foi anteriormente investigado pelo Laboratório de Neurobiologia em ratos. Da Mata *et al.*, (2000) demonstraram, em ratos infectados aos 13 dias de idade, que os astrócitos constituem a célula alvo no encéfalo. Aos 13 dias de infecção, são observados nódulos glioinflamatórios na substância branca e cinzenta do encéfalo. Já aos 30 dias de infecção, não mais se observam nódulos glioinflamatórios e infiltrado perivascular no encéfalo. Posteriormente, Silva *et al.*, (2004) investigaram o papel de macrófagos derivados do sangue nas alterações encefálicas em ratos neonatos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Nesta condição, há aparecimento de macrófagos ED1<sup>+</sup>, ED2<sup>+</sup>, linfócitos CD8<sup>+</sup> e células NK no parênquima neural, meninge e região perivascular. A depleção periférica de macrófagos, mediante a administração intravenosa de clodronato, resulta em diminuição do parasitismo e dos nódulos glioinflamatórios, assim como do infiltrado de leucócitos.

Outros autores também relatam o envolvimento do SNC na infecção experimental com *T. cruzi* em ratos neonatos, imunossuprimidos ou infectados com diferentes inóculos. Molina *et al.*, (1987) descreveram, em camundongos imunossuprimidos e com dois meses de infecção, infiltrados de células inflamatórias na meninge e na raiz ventral da medula espinhal com degeneração e necrose de neurônios. Já Losavio *et al.*, (1989), utilizando camundongos jovens infectados, demonstraram a ocorrência de infiltrado perivascular no gânglio da raiz dorsal e na raiz espinhal, assim como na musculatura vizinha. Mais tarde, Sica *et al.*, (1995) descreveram infiltrado inflamatório na raiz dorsal e gânglio da raiz dorsal e na meninge de camundongos com 15 dias de infecção. Com relação aos resultados em humanos, na avaliação clínica de 52 pacientes chagásicos crônicos, Sica *et al.*, (1995) mostraram alteração sensitiva com sintomas de parestesia na parte

distal dos membros inferiores, padrões eletromiográficos diminuídos e sinais de redução do número de unidades motoras recrutadas voluntariamente.

No presente estudo, descrevemos pela primeira vez, alterações na medula espinhal em animais adultos infectados aos 57 dias de idade. Nossos resultados mostram que o *T. cruzi* é capaz de invadir a medula espinhal de ratos adultos, tendo em vista a presença de ninhos de amastigotas em células gliais e de nódulos glioinflamatórios na substância branca e cinzenta aos 20 dias de infecção.

Estudos prévios demonstraram que ratos neonatos são mais susceptíveis a invasão por *T. cruzi* no sistema nervoso central pela imaturidade da barreira hematoencefálica (De Vries *et al.*, 1997). Ademais, algumas citocinas produzidas na fase aguda da infecção, como o TNF $\alpha$ , são capazes de induzir a quebra da barreira hematoencefálica (Tarleton, 1988). Silva *et al.* (2004) mostraram, em ratos infectados aos 10 dias de idade, diminuição da expressão de ocludina no encéfalo aos 13 dias de infecção. Estes autores mostraram, também, que a depleção de macrófagos impede a ruptura da barreira hematoencefálica.

Embora a patofisiologia da Doença de Chagas ainda não esteja esclarecida, sabe-se que a resposta imune é crucial para o controle parasitário, principalmente na fase aguda da infecção, através da expressão de citocinas, quimiocinas e outras moléculas (Savino *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2002). Nosso trabalho enfoca a expressão de citocinas próinflamatórias importantes no controle da fase aguda da infecção, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , e uma modulatória, IL-10, com papel de balanço da resposta próinflamatória.

A produção de IFN $\gamma$  ocorre de forma precoce na infecção por *T. cruzi*, entre 24 e 48 horas após a infecção, e é importante para redução da parasitemia e mortalidade. Essa citocina ativa células fagocíticas, induzindo ao aumento de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO) e produção de TNF $\alpha$  (Une *et al.*, 2003).

Em nosso estudo com animais infectados aos 57 dias de idade, observamos aumento dos níveis de IFN $\gamma$  na medula espinhal dos animais aos 20 dias e no sóleo aos 14 e 20 dias. Nestes períodos de infecção, observaram-se parasitas e infiltrado inflamatório em ambos os órgãos.

Outra citocina inflamatória de fundamental importância na defesa do hospedeiro na fase aguda da infecção por *T. cruzi* é o TNF $\alpha$ , que atua de forma sinérgica ao IFN $\gamma$ , no intuito de liderar mecanismos de destruição parasitária e de sobrevivência do hospedeiro na fase aguda da infecção (Derouich-Guergour *et al.*, 2001).

Nossos resultados não mostram expressão diferencial de TNF $\alpha$  na medula e soro aos 14 e aos 20 dias de infecção com *T. cruzi*. A expressão desta citocina mostrou-se mais elevada no músculo sóleo de ratos aos 20 dias de infecção em relação ao 14º dia. Segundo Teixeira *et al.*, (2002), a ação dessa citocina associada ao NO e demais células inflamatórias são responsáveis pelos danos teciduais descritos em vários órgãos na infecção chagásica.

Outra citocina, a IL-10, tem sido apresentada como redutora da ativação de macrófagos *in vitro* e na prevenção da destruição tecidual *in vivo* devido a forte ativação de células T associadas com a superprodução de IFN $\gamma$  (Antúnez, 2001). Além disso, IL-10 tem um importante papel imunorregulatório na infecção experimental através do balanço da resposta pró-inflamatória dirigida pelo TNF $\alpha$  em camundongos infectados por *T. cruzi*. (Savino *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostram que a infecção com *T. cruzi* resulta em elevação dos níveis séricos de IL-10 aos 14 e aos 20 dias de infecção. Este aumento de IL-10 no 20º dia de infecção foi observado também na medula espinhal. Na fase aguda da infecção experimental ocorrem maiores focos de lesão tecidual e presença de células pró-inflamatórias. O aumento na produção de IL-10 pode ter um papel protetor, em contraposição aos efeitos agressores de citocinas como o IFN $\gamma$ .

Nosso protocolo de treinamento físico leva em consideração a capacidade aeróbica individual de cada animal e a aptidão para o treinamento, em contraposição ao protocolo utilizado na maioria dos estudos. Nosso protocolo pode, portanto, minimizar alguns fatores negativos proporcionados pelo treinamento físico. Diversos autores afirmam que os benefícios e os malefícios proporcionados pela atividade física dependem do tipo, intensidade, regularidade, fatores estressantes como choques, ruídos, manipulação animal, entre outros (Dishman *et al.*, 2007). Exercícios de alta intensidade e longa duração podem causar imunossupressão e aumento da susceptibilidade à

infecção e dos níveis de cortisol. Por outro lado, exercícios de intensidade moderada, como utilizado em nosso estudo, diminuem o risco de infecções e outras doenças além de aumentar a eficiência do sistema imune (revisado por Brolinson *et al.*, 2007).

De acordo com Moraska *et al.*, (2000), o treinamento físico forçado de ratos em esteira elétrica promove redução do aumento de peso corporal em ratos aos dois meses de idade. Além disso, o treinamento forçado em esteira pode gerar adaptações potencialmente negativas, como hipertrofia da glândula adrenal, involução tímica, redução da globulina de ligação à corticosterona sérica e supressão da proliferação de linfócitos; alterações associadas normalmente ao estresse crônico.

Segundo Santos *et al.*, (2005) o estresse repetitivo por vapor de éter durante um minuto, duas vezes ao dia, pode ser considerado importante agravante na fase aguda da infecção experimental pela cepa Y de *T. cruzi* com aumento dos níveis de parasitemia nos animais submetidos a estresse repetitivo quando comparados aos não estressados.

Um estudo prévio do Laboratório de Neurobiologia utilizando protocolo de estresse de contenção por duas horas durante 5, 9, 13 ou 20 dias em camundongos da linhagem Balb/c de 6-8 semanas de idade identificou além de alterações como alopecia, leucocitose e redução de peso corporal, diminuição da resistência à infecção experimental com a cepa Y de *T. cruzi* comprovado pelo aumento do pico parasitêmico e da mortalidade (Da Silva, 2001).

Em nosso estudo, todos os animais apresentaram aumento gradual de peso corporal desde o desmame até o dia de sacrifício sem diferença entre os treinados e não treinados, infectados ou não. Estes resultados corroboraram dados recentes de nosso laboratório, em que ratos que foram submetidos a três semanas de treinamento físico prévio à lesão da substância negra, não apresentaram diminuição do peso corporal e dos níveis séricos de corticosterona quando comparados a seus controles (Hoffert, 2007).

Nossos resultados mostram que os animais submetidos a treinamento físico prévio à infecção apresentaram diminuição do infiltrado inflamatório no músculo sóleo, com relação aos não treinados, aos 14 dias de infecção. Por outro lado, não encontramos diferença entre animais infectados treinados e não treinados na análise da medula espinhal. Esses dados estão sendo descritos

pela primeira vez, visto que a literatura ainda não fornece estudos comparando treinamento físico e infecção experimental por *T. cruzi* em ratos adultos. Sendo assim, esses resultados merecem mais investigações no que diz respeito à diferença da intensidade de infiltrado inflamatório observada no sóleo aos 14 dias de infecção.

No entanto, o que se tem observado na literatura em relação aos benefícios do treinamento físico moderado é a modificação de parâmetros celulares imunes atuando de forma protetora e diminuindo o risco de infecções (Pedersen, 2000; Kaufman *et al.*, 2007). Outros estudos destacam que o treinamento físico protege contra doenças associadas com inflamação crônica mediante a produção de citocinas antiinflamatórias e miocinas produzidas e liberadas pelos músculos e que medeiam os efeitos benéficos do treinamento (Petersen & Pedersen, 2005).

Trabalhos recentes apontam que exercícios moderados aumentam a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, em especial IFN $\gamma$  em camundongos (Kohut *et al.*, 2001) e em indivíduos saudáveis (Giraldo *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2008). Nossos resultados mostram um aumento na produção de IFN $\gamma$  influenciado pelo treinamento físico no sóleo aos 14 e 20 dias de infecção. Uma hipótese muito discutida é que os exercícios moderados podem aumentar a atividade de vários parâmetros celulares imunes e assim diminuir o risco de infecções. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelo aumento da resposta imune no treinamento não estão totalmente elucidados (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Um trabalho recente demonstrou que o exercício moderado por três semanas modificou a atividade microbicida e a resposta Th-1 em camundongos tratados com LPS com aumento da produção de citocinas como TNF  $\alpha$  e IFN $\gamma$  e NO por macrófagos peritoneais (Kizaki *et al.*, 2008). Em nosso estudo, não observamos diferença nos níveis de TNF $\alpha$  na medula e soro de animais infectados treinados com relação a seus respectivos controles. Pelo contrário, no sóleo aos 20 dias de infecção, os níveis de TNF $\alpha$  foram maiores que seus controles. Tal fato provavelmente se deve a intensa atividade inflamatória e parasitária nesse período de infecção.

Estudos mais recentes comprovaram o aumento dos níveis circulantes de TNF $\alpha$  e IL-10 após treinamento físico, além de fatores de crescimento e

células pró/anti-inflamatórias que contribuem para a habilidade do organismo em responder de forma eficiente a uma variedade de mudanças como adaptação ou lesão tecidual (Zaldivar *et al.*, 2006). Dados controversos apontam que após o treinamento físico, ocorre diminuição da síntese de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  devido ao aumento da IL-10 que contribui para mediar os efeitos anti-inflamatórios do treinamento físico (Petersen & Pedersen, 2005). Outro conceito é que o aumento dos níveis de IL-10 depois do exercício contribua na mediação dos efeitos anti-inflamatórios decorrentes do treinamento físico. De fato, a IL-10 atua inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias por diferentes células, exercendo um papel importante em “orquestrar” a reação inflamatória. (Nunes *et al.*, 2008). No presente estudo, observamos que o treinamento físico aumentou os níveis de IL-10 em relação a seus controles no soro dos animais infectados nos grupos com 14 e 20 dias de infecção. Tal fato demonstra um aumento da resposta imunorregulatória após o treinamento físico, que pode ser devido a atuação do sistema nervoso autonômico, através do balanço vagal. Como não é foco de estudo, porém contribui para as respostas imunoregulatórias do treinamento físico regular, o nervo vago regula a produção de citocinas, principalmente pró-inflamatórias, prevenindo assim a inflamação aguda excessiva. Além disso, estudos em humanos identificaram que o treinamento regular modifica a variabilidade dos batimentos cardíacos em repouso e no exercício, favorecendo a um aumento da atividade eferente autonômica a favor do aumento da modulação vagal (Hottenrott, 2006). Outro trabalho, utilizando camundongos submetidos a treinamento físico crônico, demonstrou mudança do balanço autonômico no coração, com aumento do controle baroreflexo e da pressão arterial. Essas adaptações hemodinâmicas são relatadas com aumento do tônus vagal e diminuição do tônus simpático (De Angelis, 2004). Dessa forma, o nervo vago proporciona uma oportunidade no desenvolvimento de novas estratégias de regulação do sistema imune e pode ter papel adjuvante no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (Johnson & Webster, 2009).

A expressão de fatores neurotróficos na fase aguda da infecção experimental tem sido objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa que identificou aumento da expressão de NGF no coração de animais com 27-29 dias de idade, aos 20 dias de infecção com a cepa Y de *T. cruzi*. Este fator

parece ter papel na regeneração de terminais autonômicos simpáticos, subsequente a miocardite (Martinelli *et al.*, 2006).

Sabe-se que no modelo de infecção experimental, células inflamatórias são capazes de sintetizar fatores neurotróficos, principalmente na fase aguda da infecção, em que encontra-se grande número de células inflamatórias (Ehrhard *et al.*, 1993). Além disso, outras células como célula gliais, principalmente astrócitos, micróglia e oligodendrócitos (Dougherty *et al.*, 2000), macrófagos, células de Schwann e células endotélias são capazes de produzir fatores neurotróficos e atuar de modo parácrino no aporte neurotrófico ao sistema nervoso central e periférico (Acheson *et al.*, 1987; Nakahashi *et al.*, 2000).

Nosso trabalho analisa, pela primeira vez, a expressão de BDNF e NGF na medula espinhal, nervo ciático, músculo sóleo e soro de ratos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Nesses animais, ocorre aumento dos níveis de BDNF na medula espinhal aos 20 dias de infecção quando comparados aos 14 dias. Curiosamente nesse mesmo período, observamos alterações histológicas na medula espinhal desses animais. Nos demais órgãos não observamos alteração na expressão destas neurotrofinas durante a fase aguda da infecção. Dessa forma, serão necessários estudos complementares envolvendo expressão de neurotrofinas e a possível relação destas com os processos de degeneração/regeneração nos órgãos estudados.

Outro parâmetro abordado neste trabalho refere-se à expressão de fatores neurotróficos na medula espinhal, nervo ciático, sóleo e soro de animais submetidos a treinamento físico prévio a infecção experimental e a possível modulação do treinamento físico sobre estes parâmetros. Assim, após o treinamento físico, ocorreu aumento da expressão de BDNF na medula no 20º dia de infecção em relação ao 14º dia. Por outro lado, os animais infectados treinados tiveram níveis menores de NGF no ciático em relação ao controle treinado. Nos outros órgãos, não detectamos diferenças significativas.

O BDNF, assim como NGF é uma neurotrofina capaz de promover crescimento, sobrevivência e plasticidade neuronal, podendo ser modulada através do treinamento físico em esteira via transporte retrógrado do músculo sóleo para medula (Gómez-Pinilla *et al.*, 2001; Gómez-Pinilla *et al.*, 2002). Ainda, segundo Berchtold *et al.*, (2005), a produção de BDNF é aumentada

somente após 14 dias de treinamento diário e os níveis permanecem aumentados até o 14º dia de inatividade. Em nosso modelo de treinamento físico prévio a lesão, os animais foram sacrificados 14 ou 20 dias após o término do treinamento, o que pode ter dificultado a detecção de diferenças entre animais treinados e não treinados.

Outros fatores tróficos como o NGF e GDNF têm se mostrado, também, importantes na neuroproteção associada à prática de exercícios físicos (Ang *et al.*, 2003; Smith & Zigmond, 2003; Ding *et al.*, 2004; Aberg *et al.*, 2006). Em ratos e camundongos, o exercício regular pode aumentar a expressão de genes que codificam vários fatores neurotróficos, como BDNF e NGF (Dishman, 2006). Dessa forma, nossos resultados demonstram que no nervo ciático de ratos treinados, os níveis de NGF foram maiores em relação a seu controle. Os demais órgãos não sofreram alterações dos níveis de NGF pelo treinamento físico.

Poucos estudos têm analisado a influência do treinamento físico sobre a infecção experimental por *T. cruzi* ou como ferramenta na reabilitação em pacientes chagásicos. Um trabalho recente avaliou a influência do treinamento físico moderado sobre a infecção experimental com a cepa Y de *T. cruzi* em camundongos e os autores concluíram que a infecção prévia ao treinamento aeróbico induz a melhora na resposta imune à infecção (Schebeleski-Soares *et al.*, 2009). Por outro lado, um trabalho avaliou a performance do exercício sobre músculo esqueléticos em pacientes com Doença de Chagas avançada e os autores concluíram que esses pacientes apresentaram capacidade oxidativa e metabólica diminuída no músculo esquelético, sugerindo também anormalidades na distribuição de oxigênio por deterioração microvascular, e que por isso, a doença afetaria a tolerância ao exercício nesses pacientes (Montes de Oca *et al.*, 2004)

Como perspectivas futuras deste estudo, propõe-se investigar o fenótipo das células presentes no infiltrado inflamatório e a expressão de moléculas envolvidas no recrutamento celular, como ICAM-1, quimiocinas e outras citocinas contribuem para a resposta imune na fase aguda da infecção. Da mesma forma, ampliar os conhecimentos sobre as bases moleculares do treinamento físico e de fatores tróficos relacionados a ele em diversas condições, como por exemplo, treinamento concomitante a infecção

experimental, que nos ajudará a entender melhor os mecanismos envolvidos na modulação da Doença de Chagas pelo exercício.

## **6 Conclusões**

Neste trabalho, utilizamos ratos infectados aos 57 dias de idade com 300.000 tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Um grupo destes animais foi submetido a treinamento prévio em esteira por três semanas.

Nossos resultados permitem concluir o que se segue.

#### 1 A infecção experimental com a cepa Y de *T. cruzi* em ratos adultos:

- Acomete a medula espinhal com presença de ninho de amastigota e nódulos glioinflamatórios na substância cinzenta e branca aos 20 dias de infecção;
- Aumenta a expressão de BDNF ao longo da fase aguda da infecção na medula espinhal;
- Modula a expressão das citocinas nos órgãos analisados ao longo da fase aguda.

2 O Treinamento físico prévio à infecção com cepa Y de *T. cruzi* em ratos adultos:

- Não altera a curva parasitêmica e o peso corporal dos animais na fase aguda da infecção;
- Diminui o infiltrado inflamatório no músculo sóleo aos 14 dias de infecção;
- Não altera os níveis de fatores neurotróficos na medula, ciático, sóleo e soro.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 Referências Bibliográficas

Aberg, N. D; Brywe, K. G; Isgaard, J. Aspects of growth hormone and insuline-like growth factor-1 related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *The Scientific World Journal*. 6: 53-80, 2006.

Acheson, A.; Barde Y.A.; Thoenen H. High K<sup>+</sup>-mediated survival of spinal sensory neurons depends on developmental stage. *Exp Cell Res*. 170:56-63, 1987.

Alberch J; Perez-Navarro E; Canals J.M. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull*. 57:817-22, 2002.

Andersson J; Englund P; Sunnemark D; Dahlstedt A; Westerblad H; Nennesmo I; Orn A; Lundberg I.E. CBA/J mice infected with *Trypanosoma cruzi*: an experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve*. 27(4):442-8, 2003.

Andrade L.O; Machado C.R; Chiari E; Pena S.D; Macedo A.M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol*. 100(4):269-75, 2002.

Andrade, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener, Z; Andrade Z.A; Barral-Netto, M. (Eds.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan R.J., 177-200, 2000.

Ang E. T; Wong P. T. H; Moochhala S. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience*, 118: 335-345, 2003.

Antúñez M.I; Cardoni R.L. IL-12 and IFN- $\gamma$  production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett*. 71(2):103-9, 2000.

Batchelor, P.E; Liberatore, G.T; Wong, J.Y; Porritt, M.J; Frerichs, F; Donnan, G.A; Howells, D.W. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci*. 19(5):1708-16, 1999.

Berchtold N.C; Chinn G; Chou M; Kessler J.P; Cotman C.W. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 133(3):853-61, 2005.

Bijovsky, T; Elizari, M.V; Muller, L.A; Katzin, V.J; Gonzalez Cappa, S.M. Chronic infection in mice with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 25:207-214, 1983.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol*. 27:347-382, 1973.

Brolinson P.G; Elliott D. Exercise and the immune system. *Clin Sports Med*. 26(3):311-9, 2007.

Brooks, G.A; White, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J. Appl. Physiol*. 45:1009-15, 1978.

Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol*. 78(4):819-35, 2005.

Burleigh B. & Andrews N.W. A 120-k-Da alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca<sup>2+</sup>-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem*. 270: 5172-5180, 1995.

Camargos E.R.S; Franco D.J; Garcia C.M.M.G; Dutra A.P; Teixeira A.L; J.R; Chiari E; Machado C.R.S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. *Am J Trop Med Hyg*. 62(5):604-612, 2000.

Carvalho T.M; Souza W. Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct*. 45(6): 498-502, 1989.

Chae C.H; Kim H.T. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem Int*. 55(4): 208-13, 2009.

Chiaretti A; Aloe L.; Antonelli A.; Ruggiero A; Piastra M.; Riccardi R.; Tamburrini G.; Di Rocco C. Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas. *Childs Nerv Syst*. 20:412-9, 2004.

Correa-de-Santana, E.; Pinto-Mariz F.; Savino W. Immunoneuroendocrine Interactions in Chagas Disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1088: 274–283 (2006).

Cotman C.W; Berchtold N.C; Christie L.A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30(9):464-72, 2007.

Da Mata J.R; Camargos M.R; Chiari E; Machado C.R. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull.* 15;53(2):153-62, 2000.

Da Silva, G.G. Modelo experimental para estudo das interações entre os sistemas neuroendócrino e imunológico na fase aguda da infecção murina por *Trypanosoma Cruzi*. (Dissertação de Mestrado) – Fundação Instituto Oswaldo Cruz –Rio de Janeiro, 2001.

De Angelis K; Wichi R.B; Jesus W.R; Moreira E.D; Morris M; Krieger E.M; Irigoyen M.C. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol.* 96: 2174–2178, 2004.

De Bono, J.P; Adlam D; Paterson D.J; Channon K.M. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290:R926-34, 2006.

De Vries, H. E; Kuiper, J.; De Boer, A. G; Van Berkel, T. J. C; Breimer, D. D. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol. Rev.* 49:143–155; 1997.

Derouich-Guergour D; Brenier-Pinchart M.P; Ambroise-Thomas P; Pelloux H. Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol.* 31(8):763-9, 2001.

Dishman R.K; Berthoud H.R; Booth F.W; Cotman C.W; Edgerton V.R; Fleshner M.R; Gandevia S.C; Gomez-Pinilla F; Greenwood B.N; Hillman C.H; Kramer A.F; Levin B.E; Moran T.H; Russo-Neustadt A.A; Salamone J.D; Van Hoomissen J.D; Wade C.E; York D.A; Zigmond M.J. *Neurobiology of exercise. Obesity (Silver Spring).* 14(3):345-56, 2006.

Dos Santos Cunha W.D; Giampietro M.V; De Souza D.F; Vaisberg M; Seelaender M.C; Rosa L.F. Exercise restores immune cell function in energy-restricted rats. *Med Sci Sports Exerc.* 36(12):2059-64, 2004.

Dougherty K.D; Dreyfus C.F; Black I.B. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* (6 Pt B):574-85, 2000.

Dutra W.O; Gollob K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 21(3):287-92, 2008.

Edgerton, V.R; Roy, R.R. Paralysis recovery in humans and model systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 658– 667, 2002.

Edgerton, V.R; Tillakaratne, N.J.T; Bigbee, A.J; de Leon, R.D; Roy, R.R. Plasticity of the spinal circuitry after injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 145– 167, 2004.

Ehrhard P.B; Erb P; Graumann U; Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;90(23):10984-8,1993.

Flück M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol.* 209(Pt 12):2239-48, 2006.

Giraldo E; Garcia J.J; Hinchado M.D; Ortega E. Exercise intensity-dependent changes in the inflammatory response in sedentary women: role of neuroendocrine parameters in the neutrophil phagocytic process and the pro-/anti-inflammatory cytokine balance. *Neuroimmunomodulation.* 16(4):237-44, 2009.

Goin J.C; Venera G; Biscoglio de Jiménez Bonino M; Sterin-Borda L. Circulating antibodies against nicotinic acetylcholine receptors in chagasic patients. *Clin Exp Immunol.* 110(2):219-25, 1997.

Gómez-Pinilla F; Ying Z; Roy R.R; Hodgson J; Edgerton V.R. Afferent input modulates neurotrophins and synaptic plasticity in the spinal cord. *J Neurophysiol.* 92(6):3423-32, 2004.

Gómez-Pinilla, F; Ying, Z; Opazo, P; Roy, R.R; Edgerton, V.R. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur. J. Neurosci.* 13(6):1078-84, 2001.

Gómez-Pinilla, F; Ying, Z; Roy, R.R; Molteni, R; Edgerton, V.R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J. Neurophysiol.* 88, 2187– 2195, 2002.

Gomez-Pinilla, F; Ying, Z; Roy, R.R; Zhong, H; Edgerton, V.R. Role of neuromuscular activity in maintaining basal levels of neurotrophins in the spinal cord. Society for Neuroscience 32st Annual Meeting, Orlando, Abst. 732.739, 2002.

González Cappa S.M; Sanz O.P; Muller L.A; Molina H.A; Fernández J; Rimoldi M.T; Sica R.E. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 36(1):41-5, 1987.

Guerra L.B; Andrade L.O; Galvão L.M; Macedo A.M; Machado C.R. Cyclophosphamide-induced immunosuppression protects cardiac noradrenergic nerve terminals from damage by *Trypanosoma cruzi* infection in adult rats. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95(5):505-9, 2001.

Hautala A.J, Kiviniemi A. M, Tulppo M.P. Individual responses to aerobic exercise: The role of the autonomic nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 33: 107-115 (2009).

Hennigan A; O'Callaghan R.M; Kelly A.M. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 2):424-7, 2007.

Hoff. R; Teixeira R.S; Carvalho J.S; Mott K.E. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas disease. *N. Engl. J. Med.* 298:604-606; 1978.

Hoffert L. Produção de fatores neurotróficos no sistema nervoso central de ratos submetidos a treinamento físico e à lesão da substância negra do mesencéfalo por 6- hidroxidopamina. Belo Horizonte: UFMG, (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Morfologia, 2007.

Hottenrott H; Hoos K; Esperer H.D. Heart Rate Variability and Physical Exercise. *Current Status. Herz.* 31(6):544-52, 2006.

Johnston G. R; Webster N.R. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *British Journal of Anaesthesia.* 102 (4): 453–62 (2009).

Jost L; Turin M; Etchegoyen F; Leiguarda R; Torcuato A; Lotti R. Meningoencefalitis chagastica en paciente com tratamento inmunosupresor por trasplante renal. *Rev. Neurol. Argent.* 3, 425– 428, 1977.

Kafitz K.W; Rose C.R; Thoenen H; Konnerth A. Neurotrophinevoked rapid excitation through trkB receptors. *Nature.* 401, 918– 921, 1999.

Kizaki T; Takemasa T; Sakurai T; Izawa T; Hanawa T; Kamiya S; Haga S; Imaizumi K; Ohno H. Adaptation of macrophages to exercise training

improves innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 372,152–156, 2008.

Koberle F. Chagas disease and Chagas syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6:63-116, 1968.

Kohut M.L; Boehm G.W; Moynihan J.A. Moderate exercise is associated with enhanced antigen-specific cytokine, but not IgM antibody production in aged mice. *Mech Ageing Dev.*122(11):1135-50, 2001.

Kolodny M. Studies on age resistance against trypanosome infections: the resistance of rat of different ages to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Hyg* 29: 13–24, 1939.

Kregel K.C. (Chair) of the Committee to develop an APS resource book for the design of animal exercise protocols. *Resource book for the design of animal exercise protocols*, American Physiological Society, 2006.

Lages-Silva E; Ramirez L.E; Silva-Vergara M.L; Chiari E. Chagasic Meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Infect. Dis.* 34, 118– 123, 2002.

Laguens R.P; Cossio P.M; Diez C; Segal A; Vasquez C; Kreutzer E; Khouri E; Arana R.M. Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas disease. *Am. J. Pathol.* 80:153-162, 1975.

Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science*.237:1154 62, 1987.

Lima-Costa M.F; Castro-Costa E; Uchôa E; Firmo J; Ribeiro A.L.P; Ferri C.P; Prince P.A. Population-Based Study of the Association between *Trypanosoma cruzi* Infection and Cognitive Impairment in Old Age (The Bambuí Study). *Neuroepidemiology.* 32:122–128, 2009.

Lira F.S; Rosa J.C; Yamashita A.S; Koyama C.H; Batista M.L Jr; Seelaender M. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. *Cytokine.* 45(2):80-5, 2008.

Liu J.L; Kulakofsky J; Zucker I.H. Exercise training enhances baroreflex control of heart rate by a vagal mechanism in rabbits with heart failure. *J Appl Physiol.* 92: 2403–2408, (2002).

Losavio A; Jones M.C; Sanz O.P; Mirkin G; Gonzalez Cappa S.M; Muchnik S; Sica R.E. A sequential study of the peripheral nervous system

involvement in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 41(5):539-47, 1989.

Lu B; Figurov A. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev. Neurosci.* 8, 1 –12, 1997.

Machado C.R.S; Machado A.B.M; Chiari C.A. Recovery from heart norepinephrine depletion in experimental Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 27(1): 20-24, 1978.

Maldonado I.R.S.C. Alterações da musculatura esquelética na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, em rato: parasitismo, processos inflamatórios, inervação motora, degeneração e regeneração de miônios. Belo Horizonte: UFMG, (Tese de Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Morfologia, 1994.

Maldonado I.R.S.C; Ferreira M.L; Camargos E.R.S; Chiari E; Machado C.R.S. Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi* infection and rats. *Histol. Histopathol.* 19: 85-93, 2004.

Martinelli P.M; Camargos E.R; Azevedo A.A; Chiari E; Morel G; Machado C.R. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Auton Neurosci.* 130(1-2):32-40, 2006.

Massad E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect.* 136(9):1153-64, 2008.

Mastorakos G; Pavlatou M; Diamanti-Kandarakis E; Chrousos G.P. Exercise and the stress system. *Hormones (Athens).* 4(2):73-89, 2005.

McAllister A.K; Katz L.C. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 295–318, 1999.

Mirkin G.A; Jones M; Sanz O.P; Rey R; Sica R.E; González Cappa S.M. Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *Clin Immunol Immunopathol.* 73(1):69-79, 1994.

Molina H.A; Cardoni R.L; Rimoldi M.T. The neuromuscular pathology of experimental Chagas' disease. *Neurol Sci.* 81(2-3):287-300, 1987.

Molteni R; Zheng J.Q; Ying Z; Gómez-Pinilla F; Twiss J.L. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22):8473-8, 2004 .

Monteón V.M; Furuzawa-Carballeda J; Alejandre-Aguilar R; Aranda-Fraustro A; Rosales-Encina J.L; Reyes P.A. American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammatory kinetics in a murine model. *Exp. Parasitol.* 83:267-274, 1996.

Montes de Oca M; Torres S.H; Loyo J.G; Vazquez F; Hernández N; Anchustegui B; Puigbó J.J. Exercise performance and skeletal muscles in patients with advanced Chagas disease. *Chest.* 125(4):1306-14, 2004.

Moraska A; Deak T; Spencer R.L; Roth D; Fleshner M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 279:1321-1329, 2000.

Muñoz-Fernández M.A; Fernández M.A; Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett.* 33(1):35-40, 1992.

Nagib P.R.A; Dutra W.O; Chiari E & Machado C.R.S. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3+CD4-CD8- T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp Parasitol.* 116: 366-374. 2007.

Nakahashi T; Hironobu Fujimura C; Anthony Altar; Jess Li; Jun-ichi; Kambayashi Narendra; N. Tandon; Bing Sun. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *Febs Letters.* 470, 113-117, 2000.

Nance D. M; Sanders V.M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). *Brain, Behavior, and Immunity.* 21: 736–745, 2007.

Nunes R.B; Tonetto M; Machado N; Chazan M; Heck T.G; Veiga A.B; Dall'Ago P. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. *J Appl Physiol.*104(6):1641-7, 2008.

Oddo D; Casanova M; Acuna G; Ballesteros J; Marales B. Acute Chagas disease (*Trypanosomiasis Americana*) in acquired immunodeficiency disease syndrome: Report of two cases. *Hum. Pathol.* 23:41–44; 1992.

Oliveira F.P; Pedrosa R.C. Ventilatory response during exercise among chronic Chagas cardiopathy patients. *Sao Paulo Med J.* 7;124(5):280-4, 2006.

Oliveira-Filho J; Vieira-de-Melo R.M; Reis P.S.O; Lacerda A.M; Neville I.S; Cincura C; Menezes D. F; Viana L.C; Jesus P.A.P; Lopes A. A; Reis F. J. F. B; Furie K.L. Chagas disease is independently associated with brain atrophy. *J Neurol.* 256:1363–1365 (2009).

Pedersen B.K; L. Hoffman-Goetz. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol. Rev.* 80,1055–1081, 2000.

Petersen A.M; Pedersen B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 98(4):1154-62, 2005.

Pittella J.E. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* 2009.

Pittella J.E.H. Central nervous system involvement in Chagas disease. An updating. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 35:111–116; 1993.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas` disease. *The Lancet.* 1:92-100, 2001.

Radak Z; Chung H.Y; Koltai E; Taylor A.W; Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev.* 7(1):34-42, 2008.

Rassi A; Rassi A; Rassi S.G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation.*115:1101–1108, 2007.

Roberts C.K; Barnard R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J. Appl. Physiol.* 98(1):3-30, 2005.

Rocha A; Menezes A. C; Da Silva A. M; Ferreira M. S; Nishioka A. S; Burgarelli M. K. Pathology of patients with Chagas disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 261–268, 1994.

Sanches I.C; Sartori M; Jorge L; Irigoyen M.C; De Angelis K .Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *Braz J Med Biol Res.* (10) 942-948, 2009.

Sandrow-Feinberg H.R; Izzi J; Shumsky J.S; Zhukareva V; Houle J.D. Forced exercise as a rehabilitation strategy after unilateral cervical spinal cord contusion injury. *J Neurotrauma.* 26(5):721-31, 2009.

Santos C.D; Caldeira J.C; Toldo M.P; Prado J.C. *Trypanosoma cruzi*: effects of repetitive stress during the development of experimental infection. *Exp Parasitol.* 110(2):96-101, 2005.

Savino W; Villa-Verde D.M; Mendes-da-Cruz D.A; Silva-Monteiro E; Perez A.R; Aoki Mdel P; Bottasso O; Guiñazú N; Silva-Barbosa S.D; Gea S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18(1-2):107-24, 2007.

Scarlsbrick I.A; Isackson P.J; Windebank A.J. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the adult rat spinal cord: regulation by the glutamate receptor agonist kainic acid. *J. Neurosci.* 19, 7757– 7769, 1999.

Schebeleski-Soares C; Occhi-Soares R.C; Franzói-de-Moraes S.M de Oliveira Dalálio M.M; Almeida F.N; Ornelas Toledo M.J de Araújo SM. Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* 34(4):659-65, 2009.

Schofield C.J; Jannin J; Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22(12):583-8, 2006.

Seebach B.S; Arvanov V; Mendell L.M. Effects of BDNF and NT-3 on development of Ia/motoneuron functional connectivity in neonatal rats. *J. Neurophysiol.*, 81, 2398±2405, 1999.

Shimizu K; Kimura F; Akimoto T; Akama T; Tanabe K; Nishijima T; Kuno S; Kono I. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. *Exerc Immunol Rev.*14:24-37, 2008.

Sica R.E; Gonzalez Cappa S.M; Sanz O.P; Mirkin G. Peripheral nervous system involvement in human and experimental chronic American trypanosomiasis. *Bull Soc Pathol Exot.* 88(4):156-63, 1995.

Siegel G.J; N.B. Chauhan. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 33:199-227, 2000.

Silva G.C; Nagib P.R.A; Chiari E; Van Rooijen N; Machado C.R.S; Camargos E.R.S. Peripheral macrophage depletion reduces central nervous system parasitism and damage in *Trypanosoma cruzi*-infected suckling rats. *Journal of Neuroimmunology.* 149:50–58, 2004.

Silva J.S; Aliberti J.C.S; Martins G.A; Souza M.A; Souto J.T; Pádua M.A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res. 31: 111-115. 1998.

Skaper S.D; F.S. Walsh. Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. Mol Cell Neurosci. 12:179-93, 1998.

Smith A. D; Zigmond M. J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. Experimental Neurology, 184: 31-39, 2003.

Smith H.K; Maxwell L; Rodgers C.D; McKee N.H; Plyley M.J. Exercise-enhanced satellite cell proliferation and new myonuclear accretion in rat skeletal muscle. J Appl Physiol. 90(4):1407-14, 2001.

Song X.Y; Li F; Zhang F.H; Zhong J.H; Zhou X.F. Peripherally-derived BDNF promotes regeneration of ascending sensory neurons after spinal cord injury. Plos one. 5;3(3):e1707, 2008.

Sousa L; Botoni F.A; Britto R.R; Rocha M.O; Teixeira A.L. Jr; Teixeira M.M; Reis A.M; Oliveira B.M; Ribeiro A.L. Six-minute walk test in Chagas cardiomyopathy. International Journal of Cardiology. 125; 139–141, 2008.

Tanowitz H.B; Kirchhoff L.V; Simon D; Morris S.A; Weiss L.M; Wittner M. Chagas` disease. Clin. Microbiol. Rev. 5:400-419; 1992.

Tarleton R.L. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. J Immunol.140(8):2769-73, 1988.

Teixeira A.R; Nascimento R.J; Sturm N.R. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101(5):463-491, 2006.

Teixeira M.L; Dvorak J.A. *Trypanosoma cruzi*: Histochemical characterization of parasited skeletal muscle fibres. J. Protozool. 32: 339-341, 1985.

Teixeira M.M; Gazzinelli R.T; Silva J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol. 18(6):262-5, 2002.

Tekiel V; Losavio A; Jones M; Muchnik S; González-Cappa S.M. Changes in the mouse sciatic nerve action potential after epineural injection of sera from *Trypanosoma cruzi* infected mice. Parasite Immunol. 23(10):533-9, 2001.

Tekiel V; Oliveira G.C; Correa-Oliveira R; Sánchez D; González-Cappa S.M. Chagas' disease: TCRBV9 over-representation and sequence oligoclonality in the fine specificity of T lymphocytes in target tissues of damage. *Acta Trop.* 94(1):15-24, 2005.

Thoenen H; Barde Y.A; Davies A.M; Johnson J.E. Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp.* 126:82-95, 1987.

Une C; Andersson J, Orn A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* .134:195–201, 2003.

Van Praag H; Kempermann G; Gage F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci.* 2, 266±270, 1999.

Vaynma S; Ying Z; Gomez-Pinilla F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience.*122(3):647-57, 2003.

Vespa G.N.R; Cunha F.Q; Silva J.S. Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasit *in vitro*. *Infect. Immunol.* 62:5177-5182, 1994.

Wang S.W. Effects of restraint stress and serotonin on macronutrient selection: a rat model of stress-induced anorexia. *Eat Weight Disord.* 7(1):23-31, 2002.

Ying Z; Roy R.R; Edgerton V.R; Gomez-Pinilla F. Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. *Brain Res.* 987, 93– 99, 2003.

Ying Z; Roy R.R; Zhong H; Zdunowski S; Edgerton V.R; Gomez-Pinilla F. BDNF-exercise interactions in the recovery of symmetrical stepping after a cervical hemisection in rats. *Neuroscience.* 155(4):1070-8, 2008.

Zaldivar F; Wang-Rodriguez J; Nemet D; Schwindt C; Galassetti P; Mills P.J; Wilson L.D; Cooper D.M. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol.* 100(4):1124-33, 2006.

Zdrenghia D; Poantă L; Pop D; Zdrenghia V; Zdrenghia M. Physical training--beyond increasing exercise capacity. Rom J Intern Med. 2008;46(1):17-27.