

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-graduação em Patologia

Natália Katley Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE TERMINAÇÕES NERVOSAS  
AUTONÔMICAS E EXPRESSÃO DE NEUROTROFINAS (NGF E BDNF) E  
SEUS RECEPTORES NO CORAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DA  
DOENÇA DE CHAGAS**

**Belo Horizonte, 2017**

Natália Katley Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE TERMINAÇÕES NERVOSAS  
AUTONÔMICAS E EXPRESSÃO DE NEUROTROFINAS (NGF E BDNF) E  
SEUS RECEPTORES NO CORAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL DA  
DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia

**ORIENTADORA: Dra. Patrícia Massara Martinelli**

**Belo Horizonte, 2017**

*“A poesia está guardada nas palavras — é tudo que eu sei.  
Meu fado é o de não saber quase tudo.  
Sobre o nada eu tenho profundidades.  
Não tenho conexões com a realidade.  
Poderoso para mim não é aquele que descobre ouro.  
Para mim, poderoso é aquele que descobre as insignificâncias (do mundo e as nossas).  
Por essa pequena sentença, me elogiaram de imbecil.  
Fiquei emocionado.  
Sou fraco para elogios.”*

*Manoel de Barros*

## **APOIO INSTITUCIONAL**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia (Profa. Conceição Machado), localizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, e no Centro de Microscopia, ambos da Universidade Federal de Minas Gerais

Todas as técnicas e experimentos foram realizados sob a orientação da Profa. Dra. Patrícia Massara Martinelli (Departamento de Morfologia).

Essa pesquisa contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente aos ensinamentos de minha orientadora, professora Dra. Patrícia Massara, com quem tive o prazer de iniciar minha vida na pós-graduação. Ela, que com todo profissionalismo e delicadeza, me orientou de forma ímpar. Acreditou em mim e fez desses dois anos, os de maior crescimento em minha vida profissional! Exemplo de sabedoria e bom humor, paciência e elegância. Serei eternamente grata!

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as decisões! Que vibram pelo meu sucesso e me fortalecem nos momentos de dificuldades! Vocês são meu maior orgulho, meu exemplo e meu porto seguro! Amo vocês!

À Lorran e Leandro, que com toda calma, escutaram minhas lamúrias e sempre tentaram me acalmar! Que também, sempre me apoiaram de forma incondicional.

À minha amada família, avós e tias, que com todo amor e carinho sempre acreditaram em mim. Em especial, agradeço minha avó Concebida, que viu em mim seu sonho ser realizado e que com toda ternura, sempre me colocou em suas orações.

Ao Rodrigo, pelas conversas e importante ajuda nos experimentos. Sua contribuição foi essencial.

À aluna de iniciação científica, Sara Delaine, pelo apoio no preparo de lâminas para imunofluorescência e cuidado com os animais.

Aos queridos amigos Roberta Carvalho e Denilson Cunha, que compartilharam comigo todas as dificuldades e alegrias. Que dividiram comigo toda a experiência em microscopia eletrônica e fizeram dos meus dias, os mais divertidos! Obrigada por todas as sessões no microscópio e tardes no ultramicrotomo!

À professora Dra. Elizabeth Ribeiro, pela oportunidade no Centro de Microscopia da UFMG e por todo o ensinamento em microscopia eletrônica.

Ao corpo diretor do Centro de Microscopia da UFMG que possibilitou a conciliação do trabalho com minha formação como Mestre. Em especial ao professor Dr. Gregory Kitten, que me orientou com seus ricos conhecimentos acerca da imunofluorescência.

Aos colegas de trabalho do Centro de Microscopia da UFMG, que acompanharam toda minha jornada. Em especial, Érico e Miquita, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao Prof. Egler Chiari, do laboratório de Parasitologia da UFMG, pela colaboração com a cepa de *Trypanosoma cruzi*.

Aos técnicos, Carlos Henrique da Silva e Afonso da Costa Viana pela ajuda no criostato e infecção dos animais, respectivamente.

Aos professores Dr. Hermann Rodrigues, Dra. Milene Rachid e Dra. Camila Megale por gentilmente aceitarem compor minha banca.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Patologia e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

À Deus, por sempre acompanhar e guiar meus passos.

Com certeza, sem a ajuda de todos, eu não teria conseguido! Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

O presente estudo avaliou a ultraestrutura de varicosidades autonômicas e a expressão das neurotrofinas NGF (Fator de Crescimento Nervoso) e BDNF (Fator neurotrófico Derivado do Cérebro), além de seus receptores TrkA, TrkB e p75, no ventrículo de ratos infectados experimentalmente com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Amostras de ventrículo de animais com 13, 20, 30 e 60 dias de infecção (ddi) e seus controles foram processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Imunofluorescência foi usada para análise da densidade de fibras nervosas e da expressão de receptores no miocárdio. A dosagem dos níveis de NGF e BDNF foi feita por ELISA. Observou-se redução severa da inervação ventricular aos 13 e 20 ddi, enquanto a análise ultraestrutural mostrou que varicosidades autonômicas com sinais de degeneração, incluindo redução no número e alteração na morfologia de vesículas de neurotransmissores. Aos 30 e 60 ddi observou-se reinervação parcial do miocárdio, que apresentou varicosidades tanto degeneradas quanto normais. Os níveis de NGF elevaram-se significativamente aos 13 ddi no soro e aos 20 ddi no tecido cardíaco. Níveis de BDNF não se alteraram no coração, mas foram reduzidos no sangue aos 13 e 20 ddi. Aumento da expressão de TrkA no miocárdio foi observado aos 13 ddi, principalmente em áreas de endotélio vascular. Aos 20 ddi a imunoreatividade também foi maior, porém difusa em todo o miocárdio. A expressão do receptor TrkB aumentou aos 30 ddi e foi difusa no miocárdio, enquanto a de p75 se elevou aos 20 ddi, porém foi restrita a áreas de interstício. Tais dados sugerem participação de NGF e BDNF, via seus receptores de alta e baixa afinidade, nos fenômenos degenerativos e regenerativos de fibras nervosas autonômicas cardíacas que ocorrem ao longo da infecção chagásica. As ações das neurotrofinas parecem ocorrer com cinéticas diferentes e envolvendo diferentes elementos presentes no miocárdio. A participação de outras neurotrofinas e de pró-neurotrofinas é considerada.

## PALAVRAS CHAVE

*Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas; Sistema Nervoso Autonômico; NGF; BDNF

## **ABSTRACT**

The present study evaluated ultrastructural alterations of autonomic varicosities and the expression of the neurotrophins NGF (Nerve Growth Factor) and BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) in addition to their receptors, TrkA, TrkB and p75, in the ventricles of rats experimentally infected with Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Ventricular samples of animals with 13, 20, 30 and 60 days of infection (di) and of their controls were prepared for transmission electron microscopy analysis. Immunofluorescence was used to verify the density of nerve fibers and the expression of receptors in the myocardium. Quantification of levels of NGF and BDNF was achieved by ELISA. It was observed severe denervation of the myocardium at 13 and 20 di, and both cholinergic and adrenergic varicosities presented important ultrastructural signs of degeneration, like reduction in number and alteration in the morphology of vesicles of neurotransmitters. At 30 and 60 di there was partial reinnervation of the myocardium and both degenerate and normal varicosities could be observed. Cardiac NGF levels rose significantly at 20 di, while NGF serum levels were higher at 13 di. Cardiac BDNF levels did not change in infected animals, but were reduced in the blood at 13 and 20 di. At 13 di, TrkA receptor expression was elevated, especially in vascular endothelial areas of the myocardium. At 20 di the immunoreactivity was also greater but diffuse throughout the myocardium. The TrkB receptor expression was higher at 30 di and diffuse in the myocardium, while that of p75 increased at 20 di, but was restricted to interstitial areas. These data suggest a participation of NGF and BDNF, via their both high and low affinity receptors, in the degenerative and regenerative phenomena of cardiac autonomic nerve fibers that occur along the chagasic infection. The actions of neurotrophins appear to occur with different kinetics and involve different elements present in the myocardium. The participation of other neurotrophins and pro-neurotrophins is considered.

## **KEY WORDS**

*Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Autonomic Nervous System; NGF; BDNF



## LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

### TABELAS

Tabela 01: Classificação de pacientes chagásicos crônicos de acordo com o grau de comprometimento cardíaco.....	17
---	----

### GRÁFICOS

Gráfico 01: Número de vesículas de neurotransmissores por área de varicosidade autonômica .....	42
Gráfico 02: Níveis cardíacos de NGF.....	43
Gráfico 03: Níveis cardíacos de BDNF.....	43
Gráfico 04: Níveis séricos de NGF.....	44
Gráfico 05: Níveis séricos de BDNF.....	44

### FIGURAS

Figura 01: Delineamento experimental.....	33
Figura 02: Área de seleção para corte ultrafino em microscopia eletrônica de transmissão.....	37
Figura 03: Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados com cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Imunofluorescência para proteína M de neurofilamento.....	53
Figura 04: Eletromicrografias de miocárdio ventricular de rato controle.....	55
Figura 05. Eletromicrografias de ventrículo de rato controle. Inervação autonômica...	57
Figura 06: Eletromicrografias de ventrículo de rato controle; Inervação autonômica....	59
Figura 07: Eletromicrografias de ventrículo de rato com 13 dias de infecção. Inervação autonômica.....	61
Figura 08: Eletromicrografias de ventrículo de rato com 20 dias de infecção. Inervação autonômica.....	63
Figura 09: Eletromicrografias de ventrículo de rato com 13 e 20 dias de infecção. Inervação autonômica.....	65
Figura 10: Eletromicrografia de ventrículo de rato com 30 dias de infecção. Inervação autonômica.....	67
Figura 11: Eletromicrografia de ventrículo de rato com 60 dias de infecção. Inervação autonômica.....	69

Figura 12: Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados; Imunofluorescência para receptor TrkA.....	71
Figura 13: Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados; Imunofluorescência para receptor TrkB.....	73
Figura 14. Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados; Imunofluorescência para receptor p75.....	75

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- CCC- Cardiopatia Chagásica Crônica
- ECG –Eletrocardiograma
- BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- NGF- Fator de Crescimento do Nervo
- GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Glia
- NTN- Neurturina
- PSP - Persefina
- ART- Artemina
- CDNF- Fator Neurotrófico Dopaminérgico Cerebral
- MANF- Fator Neurotrófico derivado de Astrócitos Mesencefálicos
- CNTF- Fator Neurotrófico
- IF - Fator Inibidor de Leucemia
- IL-6 - interleucina 6
- IL-11- interleucina 11
- OSM - Oncostatina M
- IGF-1 - Fator de Crescimento Tipo-Insulina 1
- FGF-1 ou FGF-a e 2/b FGF-2 ou FGF-b - Fatores de Crescimento Fibroblásticos  
1/a
- MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
- SNP- Sistema Nervoso Periférico
- SNC - Sistema Nervoso Central
- NT – Neurotrofinas
- Trk - tirosina cinase
- p75NTR – Receptor para Neurotrofina
- ACh – Acetilcolina
- nAChR – Receptor Nicotínico para Acetilcolina
- 6-OHDA – 6- hidroxidopamina
- TrkA - tirosina cinase A
- TrkB - tirosina cinase B

## SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS.....	09
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Doença de Chagas.....	12
1.1.1 Cardiopatia Chagásica.....	15
O rato como modelo experimental da doença de Chagas.....	20
2 Sistema Nervoso Autônomo Cardíaco.....	24
1.3 Fatores Neurotróficos.....	26
1.3.1 Neurotrofinas, com ênfase no Fator de Crescimento Neural (NGF) e no Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1. Animais.....	39
4.2. Infecção experimental com <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	40
4.3 Morte dos animais e colheita do material.....	40
4.4. Método de imunofluorescência - detecção da proteína de neurofilamento M (NF-M) e dos receptores de neurotrofinas.....	41
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão - análise ultraestrutural das terminações nervosas no coração.....	42
4.6 Quantificação dos níveis de NGF e BDNF por ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay).....	44
4.6.1 Tecido cardíaco.....	44
4.6.2 Sangue.....	45
4.7 Método Estatístico.....	45

<b>5. RESULTADOS</b> .....	46
5.1 Densidade de fibras nervosas no ventrículo direito.....	46
5.2 Ultraestrutura do miocárdio, com ênfase nas terminações nervosas autonômicas cardíacas.....	46
5.3 Níveis cardíacos de NGF e BDNF.....	48
5.4 Níveis séricos de NGF e BDNF.....	49
5.5 Expressão dos receptores TrkA, TrkB e p75 no ventrículo direito.....	50
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	76
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXOS.....	105

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença endêmica do continente latino-americano e que atinge principalmente populações rurais com condições sanitárias precárias. Embora prevalente na América Latina, tem sido dada maior atenção à globalização dessa doença, em função da migração de indivíduos infectados para os Estados Unidos, a Europa, Ásia e Oceania (SCHMUNIS, 2007; COURA; DIAS, 2009; BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017). A prevalência da doença de Chagas na América Latina tem se reduzido nas últimas décadas, em grande parte devido a programas de controle, tanto do vetor da doença (pela aplicação de inseticidas residuais e melhoria de moradias em áreas endêmicas) quanto da transfusão de sangue (por seleção de doadores de sangue e atividades de educação e conscientização de comunidades). A dificuldade de diagnóstico e de acompanhamento nos locais de maior ocorrência da doença torna incertos os dados epidemiológicos. Em 1985, a Organização Mundial de Saúde estimou que aproximadamente 18 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América latina, estariam infectadas, mas uma atualização de dados em 2015 reduziu esta estimativa para 6 milhões de pessoas (World Health Organization – WHO, 2016); (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017). De acordo com dados apresentados no II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas em 2015 (DIAS et al., 2016), apesar dos avanços no controle da doença de Chagas, a mesma ainda é um real problema de saúde pública na América Latina, sob diferentes padrões regionais de expressão epidemiológica. Foi estimado que, naquele ano, mais de 80% das pessoas atingidas pela doença no mundo não tinham acesso a diagnóstico e tratamento sistemáticos, sustentando o elevado impacto de morbidade e mortalidade, além do custo social da enfermidade.

A descrição da doença de Chagas pelo médico e pesquisador Carlos Chagas teve grande impacto científico e social, não só pela repercussão na saúde pública, como também pelo fato de um mesmo pesquisador identificar a doença, seu agente etiológico e o vetor (CHAGAS, 1909). Desde então, vários estudos vêm sendo realizados no sentido de esclarecer os diferentes aspectos da doença.

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido ao homem por insetos vulgarmente conhecidos como barbeiros. O *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo biológico, do qual participam um hospedeiro

invertebrado, representado pelos barbeiros - insetos triatomíneos pertencentes principalmente aos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* - e um hospedeiro vertebrado mamífero, representado por marsupiais, morcegos, roedores, carnívoros, tatus, lagomorfos e primatas (COURA, 2015). O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado da ordem Kinetoplastidea, caracterizada pela presença de uma única mitocôndria, o cinetoplasto (SOUZA, W. 2000). Apresenta três formas bem distintas, tripomastigota, amastigota e epimastigota. No sangue periférico do hospedeiro vertebrado encontra-se principalmente a forma circulante tripomastigota, embora formas amastigotas, em proporção muito menor, também possam estar presentes. As formas circulantes são sugadas pelo barbeiro durante seu repasto e, uma vez no intestino médio do inseto, os tripomastigotas sofrem transformação para a forma epimastigota replicante. A passagem para essa forma pode incluir formas intermediárias do tipo amastigota e esferomastigota. As formas esféricas e epimastigotas são formas replicantes e intercambiáveis no intestino do inseto. A forma epimastigota, uma vez no intestino posterior, sofre mudança para a forma tripomastigota metacíclica, a qual é eliminada juntamente com as fezes depositadas pelo inseto durante seu repasto. A contaminação da ferida da picada ou da mucosa do vertebrado com essas fezes leva à infecção do mesmo. Uma vez no organismo do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas invadem diferentes tipos celulares, onde se transformam em amastigotas replicantes. Estes proliferam no citoplasma das células e dão origem a tripomastigotas que, por rompimento da célula, alcançam a circulação e podem invadir novas células. Alguns tripomastigotas que não invadem células podem se transformar em amastigotas no sangue. A mistura de tripomastigotas e amastigotas no sangue completa o ciclo de vida, quando sugados juntamente com o sangue, por um barbeiro (revisões em TYLER; ENGMAN, 2001; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Além da transmissão vetorial, o parasito pode ser transmitido por transfusão sanguínea, uma via importante de disseminação da doença de Chagas em regiões urbanas onde a transmissão vetorial já é controlada (PRATA, 2001; MONCAYO, 1999; MONCAYO, 2003). Já a transmissão por via transplacentária ou congênita se dá pela colonização da placenta pelo *T. cruzi*. Ocorre em aproximadamente 5% das crianças nascidas de mães cronicamente infectadas em áreas endêmicas, com variações que dependem da região considerada (PRATA, 2001; CARLIER et al., 2015). A transmissão oral ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com barbeiros infectados ou suas fezes, carne mau

cozida de animais infectados e alimentos contaminados com urina ou secreção anal de marsupiais infectados. Esse tipo de transmissão tem ganhado maior atenção em função do aumento de sua incidência, principalmente no norte e nordeste do Brasil, além de outros países da América Latina (TOSO et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012). Mecanismos de transmissão menos frequentes incluem acidentes laboratoriais, manuseio de animais infectados, transmissão sexual, transplante de órgão de doador infectado e, mesmo, infecção criminosa (PRATA, 2001; Dias, 2006; (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; COURA, 2002; COURA, 2015).

A doença de Chagas apresenta duas fases, aguda e crônica. Durante a fase aguda, que se inicia com a infecção pelo parasita e dura entre 2 e 4 meses, os pacientes são, em sua maioria, assintomáticos, mas podem apresentar sintomas que incluem febre, edema no local da picada do inseto, edema de órgãos linfoides e hepatoesplenomegalia. Outra evidência clínica importante é a porta de entrada do parasito, denominada chagoma de inoculação, no caso de lesão nodular da pele com reação inflamatória local, ou sinal de Romaña, para a manifestação via ocular, com edema bpalpebral unilateral e enfartamento ganglionar. Nesta fase, os parasitos são facilmente detectáveis por exame direto do sangue, num período de um a dois meses. Mais raramente, pacientes na fase aguda podem desenvolver miocardite grave com manifestação de arritmias, parada cardíaca ou insuficiência cardíaca congestiva progressiva. Em determinadas regiões, crianças podem desenvolver sintomas graves - cardíacos, digestivos e, em especial, neurológicos - resultando em taxa de mortalidade entre 10 a 15%. Após a fase aguda, os pacientes entram na fase crônica, a qual geralmente inicia-se com a forma indeterminada, caracterizada pela falta de sintomas, parasitemia subclínica e sorologia positiva. Cerca de 70% dos pacientes chagásicos crônicos apresentam essa forma. Apesar de assintomática, a forma indeterminada tem adquirido maior importância científica e clínica, pois, embora pacientes possuam baixa morbidade e bom prognóstico, alguns, quando submetidos a exames mais sensíveis, podem apresentar anormalidades morfofuncionais que caracterizam estágios iniciais da doença cardíaca ou digestiva. Enquanto a maioria dos pacientes permanece na forma indeterminada indefinidamente, outros, geralmente após 10 a 20 anos, evoluem para a formas crônicas determinadas da doença, com aparecimento de comprometimento cardíaco, digestivo ou neurológico. No Brasil, aproximadamente 25% das pessoas infectadas desenvolvem a forma crônica cardíaca e cerca de 6% desenvolvem lesões no tubo digestivo,



principalmente megaesôfago e megacólon. Entretanto essas taxas de incidência podem variar de acordo com a região geográfica (revisões em ANDRADE, 1991; PRATA, 2001; TANOWITZ et al., 1992; RIBEIRO; ROCHA, 1998; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006; HOTEZ et al., 2008; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A doença de Chagas caracteriza-se por uma grande variação na severidade e na prevalência das suas diferentes formas clínicas, em diferentes regiões da América Latina (PRATA, 2001; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Não se conhece de maneira clara o que determina essa heterogeneidade, tanto epidemiológica quanto patológica, da doença. Entretanto a grande diversidade genética das populações de *T. cruzi*, a via e a carga de infecção, a capacidade do parasito de evitar a resposta imune do hospedeiro, o tipo e a efetividade dos mecanismos de resposta do hospedeiro, associados ao seu *background* genético, são considerados importantes (ANDRADE et al., 2002; MACEDO et al., 2004; CARDILLO et al., 2015; MORROT et al., 2016). Desde sua descoberta, a doença de Chagas tem sido exaustivamente estudada por vários pesquisadores, mas, em função da grande heterogeneidade de manifestações da doença em pacientes, o significado fisiopatológico e clínico de seus diversos aspectos ainda não está totalmente esclarecido e mais estudos são necessários para sua elucidação.

### **1.1.1 Cardiopatia chagásica**

A cardiopatia é a forma crônica mais importante da doença de Chagas, devido à morbidade e mortalidade e ao conseqüente impacto social. Taxas altas e prematuras de mortalidade associam-se à presença de anormalidades eletrocardiográficas, ao sexo masculino, ocorrência de arritmia complexa durante exercício e insuficiência cardíaca congestiva (MADY et al., 1994; ROCHA et al., 2003; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2009). O grau de disfunção miocárdica é considerado um dos mais importantes fatores de prognóstico da doença de Chagas em humanos (MADY et al., 1994; FREITAS et al., 2005). Nos estágios iniciais da infecção, somente um pequeno número de pacientes apresenta sinais clínicos de doença cardíaca, de forma que a maioria deles evolui de maneira silenciosa para a fase crônica. Os sintomas clínicos variam grandemente e a adaptação e tolerância do coração variam com a velocidade e qualidade do processo patogênico. Geralmente, o completo envolvimento cardíaco ocorre em torno de 20 anos após a infecção primária, embora possa ocorrer mais cedo ou mais tardiamente em alguns pacientes. Manifestações clínicas da cardiopatia chagásica severa compreendem

três sintomas principais, insuficiência cardíaca, arritmia e tromboembolismo (MACÊDO, 1997; ROCHA *et al.*, 2007).

A cardiopatia chagásica é notável por apresentar grande pleomorfismo clínico e pela individualidade dos pacientes acometidos (RIBEIRO *et al.*, 2002). Em função dessa grande variação nos aspectos clínicos da doença, Rocha e colaboradores (2003) estabeleceram uma classificação de pacientes chagásicos crônicos, dividindo-os em seis grupos, com base no grau de comprometimento cardíaco, como a seguir:

<b>Grupo clínico</b>	<b>Caracterização</b>
Forma crônica indeterminada	Assintomática, sem alteração significativa no exame físico, eletrocardiograma (ECG,) raio-X do tórax, esofagograma e enema opaco. Ausência de alterações nas avaliações com testes sensíveis (ecocardiograma, ergometria, Holter).
Cardiopatía Chagásica Crônica -CCC 1	Assintomática, sem alteração significativa no exame físico, ECG, raio-X do tórax, esofagograma e enema opaco. Testes sensíveis podem detectar anormalidades de gravidade variável.
CCC 2	Pacientes assintomáticos ou com classe I de insuficiência (“New York Heart Association - NYHA), sem sinais clínicos ou radiológicos de dilatação cardíaca, mas com discretas alterações no ECG, tais como complexos QRS de baixa voltagem, bloqueio da divisão antero-superior do ramo esquerdo, alterações discretas do segmento ST e na onda T
CCC 3	Pacientes sem manifestações de insuficiência cardíaca ou com classe funcional II (NYHA), sem dilatação cardíaca. Estes pacientes devem apresentar consideráveis alterações no ECG, tais como bloqueio do ramo direito ou contrações ventriculares prematuras monomórficas isoladas.
CCC 4	Como no grupo anterior, não há sinais de dilatação cardíaca. Entretanto, as anormalidades do ECG são significativamente mais graves e incluem bloqueio do ramo direito associado ao hemibloqueio anterior esquerdo, ondas Q anormais, ondas T negativas difusas e simétricas, bloqueio do ramo esquerdo, bloqueio atrioventricular de segundo grau Mobitz tipo II e bloqueio AV completo.
CCC 5	Pacientes com sinais clínicos, radiológicos e, especialmente, ecocardiográficos de dilatação cardíaca, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca.

**Tabela 01:** Classificação de pacientes chagásicos crônicos de acordo com o grau de comprometimento cardíaco.

A complexa etiologia da cardiopatía chagásica ainda não está completamente esclarecida e tem sido tópicó de discussão por vários estudiosos do assunto. Numerosos mecanismos têm sido propostos para explicar a variação no desenvolvimento da doença, entre eles a lesão do miocárdio, causada tanto pela presença do parasita quanto pela resposta imune do paciente, a presença de distúrbios microvasculares e a disautómia

cardíaca (MARIN-NETO et al., 2007; BONNEY; ENGMAN, 2015). No que se refere à lesão do miocárdio, essa é considerada o principal aspecto histopatológico da cardiopatia chagásica e constitui-se principalmente de uma miocardite progressiva (variando de focal ou multifocal à difusa) e fibrosante, associada à perda da função contrátil do miocárdio (KOBBERLE, 1968; ROSSI, 1991; revisões em ANDRADE, 1991; TANOWITZ et al., 1992). Miocardite focal pode ser encontrada mesmo em pacientes com a forma indeterminada e torna-se mais intensa à medida que a doença progride para formas clínicas mais severas (PRATA, 2001; ROCHA *et al.*, 2003). A substituição de cardiomiócitos por tecido fibrótico leva a um desarranjo da arquitetura do miocárdio, que conseqüente provoca mau funcionamento do sincício muscular, um fator importante no desenvolvimento de insuficiência cardíaca e arritmias (ANDRADE et al., 1978; TOSTES et al., 2005; HIGUCHI et al., 1987; UELLEND AHL et al., 2016). Segundo numerosos estudos, os mecanismos de desenvolvimento das lesões inflamatórias no miocárdio parecem envolver tanto a ação direta do parasito quanto a resposta imunológica do hospedeiro (ANDRADE, 1999; KIERSZENBAUM, 1999; TALVANI; TEIXEIRA, 2011; ESPER et al., 2015).

Quanto aos distúrbios microvasculares que ocorrem na cardiopatia chagásica, os mesmos caracterizam-se pelo colapso de arteríolas no miocárdio, com redução da luz vascular em função de espessamento da íntima, além de descapilarização do tecido, o que é diretamente relacionado com a morte de cardiomiócitos (KOBBERLE, 1968; MARIN-NETO et al., 2007; ROSSI et al., 2010). Ainda, foi demonstrado que pacientes chagásicos cardiopatas apresentam um mecanismo de vasodilatação coronariana anormal, que poderia contribuir para processos isquêmicos observados no coração desses pacientes (TORRES et al., 1995).

Outro aspecto histopatológico importante, presente em graus e extensões variáveis na cardiopatia chagásica, é a lesão do sistema nervoso autônomo, cujas conseqüências incluem arritmias, morte súbita, mau prognóstico global e cardiovascular, aumento da morbidade e da mortalidade e deficiência na adaptabilidade cardiovascular a estímulos internos e externos. A disfunção autonômica pode afetar, de maneira isolada ou combinada, as propriedades elétricas e mecânicas do miocárdio atrial e ventricular, incluindo os elementos do sistema de condução cardíaca (JUNQUEIRA; SOARES, 2002; MARIN-NETO et al., 2007; RASSI *et al.*, 2009; JUNQUEIRA JUNIOR, 2012). A desnervação do parênquima cardíaco inclui despopulação neuronal nos gânglios

parassimpáticos cardíacos (OLIVEIRA, JR.; SALAZAR, LF.; MLATA, J.; ASSI, 1986; ANDRADE, 1991; DAVILA et al., 1991) e redução de terminações nervosas autonômicas, tanto noradrenérgicas quanto colinérgicas (MACHADO et al., 2000). A perda neuronal parece ocorrer predominantemente durante a fase aguda da infecção, com a participação de três mecanismos: o parasitismo neuronal direto, a neurodegeneração provocada pela inflamação periganglionar e a reação autoimune antineuronal (KOBERLE, 1968; LOPES; TAFURI, 1983; MARIN-NETO et al., 2007; OLIVEIRA, JR.; SALAZAR, LF.; MLATA, J.; ASSI, 1986; PRATA, 2001). Apesar dos numerosos estudos demonstrando o impacto da desnervação autônoma na função cardiovascular de pacientes chagásicos, o significado funcional e clínico da mesma ainda é questão aberta a especulações. Mesmo sabendo-se que a desnervação autônoma resulta em perda significativa de adaptação cardiovascular aguda em resposta a diferentes estímulos, questiona-se se essa disautonomia pode resultar em consequências funcionais importantes a longo prazo (MARIN-NETO et al., 2007; DÁVILA et al., 2012; JUNQUEIRA JUNIOR, 2012). Além disso, tem-se sugerido que as anormalidades do sistema nervoso autônomo podem ser reversíveis, considerando-se que pacientes chagásicos podem se beneficiar do tratamento com drogas que antagonizam a ativação neurohumoral que ocorre durante o desenvolvimento da doença (DÁVILA; INGLESSIS; MAZZEI DE DÁVILA, 1998). O esclarecimento de pelo menos parte dessas dúvidas envolve, certamente, estudos mais detalhados sobre o processo lesivo das terminações autônomas ao longo da infecção chagásica e os fatores envolvidos nesse processo.

Pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas possuem bom prognóstico e normalmente considera-se que não correm risco de morte devido à infecção. Geralmente são assintomáticos, com ausência de alterações nas avaliações de rotina (DIAS; COURA, 1997; IANNI et al., 2001). Entretanto, em torno de 25% dos pacientes com essa forma da doença, quando avaliados por métodos mais sensíveis de diagnóstico, como testes autonômicos, ecocardiográficos ou eletrocardiogramas dinâmicos, apresentam anormalidades funcionais e ou estruturais significativas (RIBEIRO; ROCHA, 1998; BARROS et al., 2001; RIBEIRO et al., 2000). Considerando essas alterações, Rocha e colaboradores (2003) classificaram esses pacientes como cardiopatas crônicos chagásicos 1 (CCC1) e apontaram os mesmos como sendo de grande importância para a compreensão do desenvolvimento da doença de Chagas.

Segundo os autores, esses seriam os pacientes da forma indeterminada com grande probabilidade de evoluírem para a forma cardíaca severa e, certamente, aqueles que mais se beneficiariam de tratamento específico. Adicionalmente, o estudo de Barros e colaboradores (2011) mostrou que pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas que apresentavam distúrbios contráteis ventriculares possuíam maior frequência de arritmias, com maior comprometimento cardíaco, quando comparados com pacientes da mesma forma da doença, porém sem sinais de alteração na contratilidade ventricular. Segundo os autores, aqueles pacientes, apesar de mantida sua classificação como indeterminados, pelo menos em termos epidemiológicos, se destacavam por possuírem alterações morfofuncionais com potencial significado prognóstico, as quais deveriam ser melhor avaliadas em estudos prospectivos.

Um aspecto pouco explorado, concernente ao processo de desnervação que ocorre na cardiopatia chagásica, é o envolvimento de fatores neurotróficos. Um dos primeiros estudos relacionados é o de Martinelli e colaboradores (2011), que demonstraram, em pacientes chagásicos, aumento dos níveis séricos do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), o qual foi correlacionado com o processo de desnervação autônoma cardíaca. Ainda, alterações dos níveis de BDNF foram relacionadas com a modulação do sistema nervoso autônomo em pacientes chagásicos durante exercício (LIMA et al., 2013; COSTA et al., 2014). Entretanto, os estudos sobre a expressão de fatores neurotróficos em pacientes chagásicos são muito iniciais e ainda quase nada se conhece sobre a participação desses fatores nos processos neurodegenerativos ou regenerativos que ocorrem ao longo da doença. Em outras cardiopatias, já foi demonstrada a participação de fatores neurotróficos. Kaye *et al.* (2000) demonstraram queda na produção cardíaca do Fator Neurotrófico Neural (NGF) na insuficiência cardíaca congestiva, relacionando-a com a redução da inervação autônoma do coração.

### **1.1.2 O rato como modelo experimental da doença de Chagas**

A utilização de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* tem contribuído grandemente para a elucidação de vários aspectos da doença de Chagas, embora muitos deles ainda permaneçam não esclarecidos. A lesão do sistema nervoso autônomo tem sido estudada em diferentes modelos experimentais da infecção (TAFURI, 1970; ANDRADE, 1984; MACHADO E RIBEIRO, 1989; MACHADO *et al.* 1979; CHAPADEIRO et al., 1991; DE SOUZA *et al.*, 1996; ANDRADE et al., 1997;

MARTINELLI et al., 2006; RODRÍGUEZ-ANGULO et al 2013; CUBA et al., 2014; DALIRY et al., 2014).

O rato jovem infectado com *T. cruzi*, tem sido considerado bom modelo da fase indeterminada da doença, uma vez que após a fase aguda da infecção, os animais, apesar da persistência do parasita no organismo, não apresentam sintomas da doença e não são observados processos histopatológicos importantes em seus órgãos (ALVES; MACHADO, 1984; MACHADO et al., 1978; 1984; MACHADO & RIBEIRO 1989; CAMARGOS et al., 2000; GUERRA, et al., 2001; MALDONADO et al., 2004; MARTINELLI et al., 2006). Estudos de dosagem de neurotransmissores e de de marcação destes por fluorescência no tecido mostraram, de maneira indireta, que no coração desses animais, durante a fase aguda da infecção, ocorre desnervação autônoma simpática e parassimpática, intensa ou completa, associada à miocardite (MACHADO et al., 1978, 1979, 1987; MACHADO E RIBEIRO, 1989). A desnervação parassimpática parece não ser total e está associada à redução importante dos níveis cardíacos de acetilcolina (MACHADO al., 1979; 1987). A desnervação simpática ocorre sem lesão dos corpos neuronais do gânglio cervical superior (CAMARGOS et al., 1996) e processos inflamatórios locais são considerados importantes na destruição das terminações nervosas (MACHADO & RIBEIRO, 1989; MELO & MACHADO, 1998; GUERRA et al., 2001). Após a fase aguda da infecção nesse modelo, foi observada, pelos mesmos métodos bioquímicos e histoquímicos, recuperação dos níveis de neurotransmissores e da densidade normal de inervação autônoma (MACHADO et al., 1978, 1979, 1987). Quanto à avaliação do processo lesivo das terminações nervosas cardíacas durante a infecção, foram descritos, de maneira breve, alguns aspectos ultraestruturais das terminações autônomas no rato (MELO; R.S. MACHADO, 1998) e em camundongos (RIBEIRO et al., 2002), após a infecção.

Quanto à participação de fatores neurotróficos no processo degenerativo/regenerativo das terminações nervosas cardíacas ao longo da infecção chagásica experimental, o primeiro estudo foi realizado por Martinelli e colaboradores (2006), que mostraram aumento importante dos níveis cardíacos do NGF e do Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF) em ratos infectados com *T. cruzi*. De maneira interessante, essa elevação ocorre na fase aguda da infecção, quando observa-se intensa desnervação simpática do miocárdio, com retorno a valores semelhantes aos dos animais controles durante a fase crônica da infecção, quando ocorre recuperação da inervação noradrenérgica cardíaca.

Estudos das alterações dos níveis de fatores neurotróficos e seus receptores ao longo da doença de Chagas experimental e do papel dessas alterações no processo lesivo das terminações nervosas cardíacas podem fornecer dados complementares sobre a patogênese da doença, principalmente no que se refere à disfunção autônoma.

## **1.2. SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO CARDÍACO**

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) tem por função a transmissão de sinais eferentes aos diversos órgãos do corpo. É dividido em simpático e parassimpático, de acordo com critérios fisiológicos, anatômicos e farmacológicos. A ação das fibras nervosas sobre os órgãos é mediada pela liberação de um neurotransmissor, dentre os quais os mais importantes são a acetilcolina e a noradrenalina, essa última também conhecida como norepinefrina (GUYTON; HALL, 2006; FREITAS, 1999).

A via motora do SNA, tanto do simpático quanto do parassimpático, constitui-se de dois neurônios principais, um pré-ganglionar e outro pós-ganglionar. O neurônio pré-ganglionar possui seu corpo celular localizado no interior do Sistema Nervoso Central (SNC), enquanto o corpo celular do neurônio pós-ganglionar localiza-se em um gânglio autonômico. Com relação aos neurônios pós-ganglionares, no sistema simpático eles estão localizados nos gânglios paravertebrais ou nos pré-vertebrais, que se encontram a alguma distância dos órgãos-alvo. No caso do sistema parassimpático, os neurônios pós-ganglionares são encontrados nos gânglios parassimpáticos que estão próximos ou, mesmo, localizados nas paredes dos órgãos alvo (KAWASHIMA et al., 2005).

No que se refere aos neurotransmissores presentes nas fibras autonômicas, fibras simpáticas pós-ganglionares e parassimpáticas pré e pós-ganglionares contêm principalmente a acetilcolina e são, portanto, denominadas colinérgicas. Já as fibras simpáticas pós-ganglionares são denominadas adrenérgicas ou, mais corretamente, noradrenérgicas, por conterem o neurotransmissor noradrenalina ou norepinefrina (JAMALI et al. 2016).

O sistema nervoso cardíaco intrínseco contempla uma intrincada rede neural, formada por plexos ganglionares axônios interligados. No coração humano, estima-se a presença de mais de 14.000 neurônios parassimpáticos, distribuídos em aproximadamente 554 gânglios cardíacos. Os dados sobre a inervação noradrenérgica, ainda não são completamente descritos, mas estudos apontam para 5.000 neurônios (ARMOUR et al,



1997). Os átrios apresentam tanto terminais nervosos colinérgicos como noradrenérgicos. No entanto, alguns autores defendem um predomínio de terminais colinérgicos. Já nos ventrículos há predominância de nervos noradrenérgicos (DASTUR et al, 1989; CHIBA & YAMAUCHI, 1970). Os nervos simpáticos ramificam-se sobre as quatro câmaras do coração, atingindo o pericárdio, miocárdio e endocárdio. Trabalhos histoquímicos, mostram que a densidade dos terminais simpáticos é extremamente variável nas diferentes regiões do coração.

O SNA desempenha papel regulador, entre outros, da função cardíaca. Os nervos simpáticos e parassimpáticos funcionam de forma recíproca para controlar a frequência cardíaca (cronotropia) e a velocidade de condução (dromotropia), através da atuação dos mesmos sobre cardiomiócitos do sistema de condução gerador dos batimentos cardíacos. Ainda, os nervos simpáticos, inervando cardiomiócitos das aurículas e dos ventrículos, modulam também a força de contração e relaxamento (inotropia e lusitropia, respectivamente) do miocárdio (HASAN 2013; IEDA 2013). Os diferentes padrões de inervação nas regiões cardíacas, como átrios, aurículas, ventrículo e o sistema de condução, influenciam as funções cardíacas de diferentes maneiras (IEDA ET AL., 2008; IEDA & FUKUDA, 2009). Assim, os efeitos de ambas as divisões do sistema nervoso autônomo cardíaco estão em constante ação para que ocorra uma estabilidade eletrofisiológica do coração (JAMALI et al. 2016; COOTE et al., 2016).

Fibras nervosas autonômicas apresentam características morfológicas bem descritas, que incluem a presença de dilatações regulares ao longo de seus trajetos, conhecidas como varicosidades ou botões de passagem. Tais botões, são locais pré-sinápticos, onde se concentram as vesículas de neurotransmissores (CHIBA & YAMAUCHI, 1970; GORDON et al., 1993; MITRANI E ZIPES, 1994, CHOW et al., 1995). Ultraestruturalmente, pode-se distinguir dois tipos de varicosidades autonômicas cardíacas, com base no aspecto das vesículas de neurotransmissores que elas contêm. Varicosidades colinérgicas são assim definidas por possuírem predominantemente pequenas vesículas eletrólucidas, que contêm principalmente acetilcolina. No entanto, também são encontradas, em menor número, grandes vesículas granulares com núcleo eletrndenso. Além da acetilcolina, essas vesículas são consideradas conterem diferentes peptídeos, o mais descrito sendo, o Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP). A grande concentração desses peptídeos reflete na formação do núcleo denso no interior da vesícula. Já as varicosidades classificadas como noradrenérgicas apresentam grande

número de pequenas vesículas granulares, além de pequenas eletrólucidas e, ainda, poucas grandes vesículas eletrondensas. Todas elas contêm noradrenalina e outros peptídeos como o neuropeptídeo Y (NPY) e neurotensina (CHIBA & YAMAUCHI, 1970; SMOLEN, 1978; PRINCE, 1996; WIDIAPRADJA *et al.*, 2017). De acordo com os estudos ultraestruturais de Dastur *et al.*, 1989 e Kyösola *et al.*, 1976, não existe nenhuma área de contato próximo entre terminais nervosos e células cardíacas. Não foram observadas especializações da membrana plasmática de axônios ou de células epiteliais, como visto nas sinapses convencionais do sistema nervoso central. Assim, considera-se que a ação dos neurotransmissores ocorra após difusão dos mesmos no interstício, até atingir a célula alvo. Além disso, sabe-se que ao longo de um único axônio, podem haver várias varicosidades contendo muitas vesículas de neurotransmissores (CHIBA & YAMAUCHI, 1970).

### **1.3 FATORES NEUOTRÓFICOS**

Fatores neurotróficos constituem grupo heterogêneo de polipeptídeos que, através de receptores específicos, exercem papel essencial no desenvolvimento, diferenciação, sobrevivência, manutenção e regeneração do sistema nervoso de mamíferos (MARKUS; PATEL; SNIDER, 2002; LANNI *et al.*, 2010). Atualmente, numerosos estudos têm elucidado diversas outras funções destas substâncias, durante o desenvolvimento, idade adulta, envelhecimento e doença, e cada dia novas propriedades são atribuídas às mesmas. Entre elas, incluem-se a participação em processos de proliferação e ativação celular (COSTANTINI & SHAKYA, 2006; NICO *et al.*, 2008; BLAIS *et al.*, 2013), controle hormonal (GILBERT; LASLEY, 2013; PLUCHINO *et al.*, 2013), balanço energético (FARGALI *et al.*, 2012; RIOS, 2012), gametogênese (CHAVES *et al.*, 2012; LINHER-MELVILLE; LI, 2013), estresse (CIRULLI; ALLEVA, 2009; SARUTA; SATO; TSUKINOKI, 2010), plasticidade, aprendizado e memória (BERRY; BINDOCCI; ALLEVA, 2012; BEKINSCHTEIN; CAMMAROTA; MEDINA, 2014). Corroborando seu aspecto multifuncional, fatores neurotróficos podem ser secretados por diferentes tipos celulares, tais como neurônios (MCWILLIAMS *et al.*, 2015; YUZWA *et al.*, 2016), células musculares (MARTINELLI *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2015), células endoteliais e outras células epiteliais (MING *et al.*, 2009; HELAN *et al.*, 2014), adipócitos (SORNELLI *et al.*, 2009), células endócrinas (MÜLLER *et al.*, 2006; KONDO *et al.*, 2013) e células do sistema imune (NOGA *et al.*, 2003; HIRUMA;

HIKAWA; KAWAKAMI, 2012). No que se refere a suas ações em neurônios, fatores neurotróficos foram descritos originalmente como derivados de órgãos alvos dos neurônios e transportados retrogradamente por estes para exercerem suas funções no corpo neuronal. Estudos recentes tem estabelecido os diferentes eventos celulares e moleculares envolvidos no transporte retrógrado de fatores neurotróficos e a importância dos mesmos para manutenção da função neuronal (ZWEIFEL; KURUVILLA; GINTY, 2005; HARRINGTON; GINTY, 2013; ITO & ENOMOTO, 2016). Por outro lado, diferentes estudos mostraram que esses fatores podem ser sintetizados pelos próprios neurônios e então apresentar efeitos parácrinos, autócrinos ou mesmo intácrinos (BAQUET; BICKFORD; JONES, 2005; ACHESON & LINDSAY, 1996; MENDELL, 1996; MCWILLIAMS et al., 2015; YUZWA et al., 2016).

Além das funções acima descritas, fatores neurotróficos participam de diversos processos patológicos, como degeneração e regeneração de nervos (LYKISSAS et al., 2007; JOHNSON; CHARCHANTI; SOUCACOS, 2008; GORDON, 2010), inflamação (LINKER; GOLD; LUHDER, 2009) e dor (TRANG; BEGGS; SALTER, 2011; (MCKELVEY; SHORTEN; O'KEEFFE, 2013), o que lhes confere um papel importante no estabelecimento de novas terapias para o tratamento de diferentes tipos de doenças. Por suas ações efetivas em funções neuronais, fatores neurotróficos têm sido considerados apropriados para o tratamento de doenças neurodegenerativas dos sistemas nervosos central e periférico. Várias estratégias de administração desses fatores têm sido testadas experimentalmente e a compreensão detalhada de suas ações no desenvolvimento, manutenção e regeneração de neurônios é essencial para validar seu uso como agentes terapêuticos (MITRE; MARIGA; CHAO, 2016; (BARTUS; JOHNSON, 2017). Em processos neurodegenerativos, o padrão de expressão de fatores neurotróficos é completamente distinto do encontrado no tecido intacto. Assim, na degeneração axonal após secção de nervos, a expressão dos fatores torna-se, na maioria das vezes, consideravelmente aumentada e esse aumento é revertido durante a regeneração, com retorno aos padrões presentes previamente à lesão (HEUMANN et al., 1987; (MATSUOKA; MEYER; THOENEN, 1991) MEYER ET AL., 1992; FUNAKOSHI ET AL., 1993; (BOYD; GORDON, 2003; SEBBEN; LICHTENFELS; DA SILVA, 2011). Importante, a expressão de fatores neurotróficos e de seus receptores em processos de degeneração nervosa é diferencialmente regulada, de forma

que os mesmos podem agir cooperativamente para promover a regeneração das fibras nervosas (FUNAKOSHI et al., 1993; MARCOL et al., 2007; NISHI, 1994; LEWIN & BARDE, 1996; BOYD; GORDON, 2003; ÖNGER et al., 2016).

Em mamíferos são descritas 3 famílias de fatores neurotróficos. A família das Neurotrofinas inclui o Fator de Crescimento Neural (NGF), o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e as Neurotrofinas 3 e 4/5. A família do Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF) é composta pelo próprio GDNF, pela Neurturina (NTN), pela Persefina (PSP) e pela Artemina (ART) (Airaksinen et al., 2002). A terceira família de fatores neurotróficos foi proposta recentemente e apresenta dois membros, o Fator Neurotrófico Dopaminérgico Cerebral (CDNF) e o Fator Neurotrófico derivado de Astrócitos Mesencefálicos (MANF) (LINDHOLM; SAARMA, 2010). Ainda, é descrito o Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF), o qual não pertence à nenhuma das três famílias, sendo um fator neurotrófico único, pertencente à superfamília das neuroquinas, que inclui o Fator Inibidor de Leucemia (LIF), as interleucinas 6 (IL-6) e 11 (IL-11) e a Oncostatina M (OSM) (SLEEMAN et al., 2000). Finalmente, alguns fatores de crescimento, não denominados fatores neurotróficos, são considerados ter atividade neurotrófica, entre eles o Fator de Crescimento Tipo-Insulina 1 (IGF-1) e os Fatores de Crescimento Fibroblásticos 1/a (FGF-1 ou FGF-a) e 2/b (FGF-2 ou FGF-b) (LANNI et al., 2010). Será dada atenção às neurotrofinas, especialmente o NGF e o BDNF, alvos do presente estudo.

### **1.3.1 Neurotrofinas, com ênfase no Fator de Crescimento Neural (NGF) e no Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)**

Neurotrofinas compreendem uma família de fatores neurotróficos relacionados, que partilham estrutura altamente homóloga. Possuem grande similaridade na seqüência de aminoácidos e quando se associam aos seus receptores formam homodímeros, por ligação não covalente (McDonalds & Chao, 1995; LINDSAY; YANCOPOULOS, 1996; HALLBÖÖK, 1999; TERENGI, 1999). Assim como muitos outros polipeptídeos ativos, neurotrofinas são sintetizadas como precursores, pró-neurotrofinas, as quais são posteriormente clivadas para darem origem às formas maduras. A clivagem da pró-neurotrofina pode ocorrer na via secretória ou após sua secreção, de forma que receptores podem ser expostos a ambas, proneurotrofina e neurotrofina madura (HEMPSTEAD, 2006; TENG et al., 2010).

Originalmente descritas como fatores de sobrevivência para neurônios sensoriais e simpáticos, neurotrofinas são atualmente reconhecidas por controlarem não só a sobrevivência, mas também o desenvolvimento e a função de diferentes populações neuronais, nos sistemas nervosos periférico e central (MANESS et al., 1994; BIBEL; BARDE, 2000). Ainda, numerosos estudos com modelos experimentais apontam efeitos promotores importantes das neurotrofinas em diferentes neuropatias (SAHENK, 2006; TWISS; CHANG; SCHANEN, 2006; VERGE et al., 2014). Mais especificamente em relação ao coração, neurotrofinas exercem efeitos diversos nesse órgão, tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta. Várias patologias que envolvem comprometimento cardiovascular caracterizam-se por alteração na expressão ou atividade de neurotrofinas, entre elas aterosclerose, hipertensão, diabetes, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca. Nessas condições, a expressão alterada de neurotrofinas ou de seus receptores tem efeito direto sobre os componentes vasculares e sobre os nervos que modulam as funções vascular e cardíaca (CAPORALI & EMANUELI, 2009; Emanuelli *et al.*, 2014).

Os efeitos biológicos das neurotrofinas são mediados pela ativação de dois tipos de receptores de membrana, os receptores tirosina cinase (Trk) e o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR). A ligação de neurotrofina a receptores Trk provoca a sua dimerização e fosforilação de resíduos de tirosina. Estes resíduos formam locais de ancoragem para proteínas adaptadoras e enzimas, as quais acoplam os receptores a cascatas de sinalização intracelular que, em última instância, regulam o crescimento celular e a sobrevivência (BARBACID, 1995; SEGAL; GREENBERG, 1996; KAPLAN; MILLER, 2000; PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001). A especificidade da ação de cada neurotrofina ocorre pela sua interação seletiva com membros da família de receptores do tipo tirosina cinase (Trk). Assim, o NGF liga-se especificamente a TrkA (KAPLAN et al., 1991; KLEIN et al., 1991), enquanto BDNF e NT 4/5 ligam-se ao TrkB. Já a NT3 interage com TrkC, além de poder ligar-se também, embora com menor afinidade, aos receptores TrkA e TrkB (KLEIN et al., 1991; SQUINTO et al., 1991; LAMBALLE; KLEIN; BARBACID, 1991; IP et al., 1993). Além disso, todas as neurotrofinas se ligam com afinidade semelhante ao receptor de neurotrofina p75, um membro da superfamília de receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF). A sinalização de p75 depende de vários factores, entre eles o tipo de célula, o estado de diferenciação celular, a ligação à neurotrofina e a disponibilidade de molécula

adaptadora intracelular. Isto conduz a respostas celulares diversas e mesmo divergentes, como sobrevivência celular, apoptose, crescimento e retração de neuritos, mielinização, regulação do ciclo celular, migração celular e invasão. Ainda, p75 parece interagir primariamente com as proformas das neurotrofinas, tendo como efeito principal a indução de morte celular (LEE et al., 2001; TOMELLINI et al., 2014; BOTHWELL, 2016). Os dois tipos de receptores, Trk e p75, são frequentemente expressos pela mesma célula e os sinais gerados por ambos podem aumentar ou opor-se mutuamente. As respostas celulares às neurotrofinas são em grande parte moduladas por essa dupla ação, e vários estudos enfocam as vias de transdução de sinal usadas por esses receptores para promover os efeitos das neurotrofinas (KAPLAN; MILLER, 2000; PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001; ROUX; BARKER, 2002; BOTHWELL, 2016).

### *NGF*

O Fator de Crescimento Neural (NGF) foi descrito por LEVI-MONTALCINI E HAMBURGER (1953), tendo sido, a partir daí, estabelecido seu papel no desenvolvimento, diferenciação e manutenção de neurônios (LEVI-MONTALCINI & ANGELETI, 1968; THOENEN & BARDE, 1980; LEVI-MONTALCINI, 1987). NGF foi primeiramente purificado da glândula salivar do camundongo e descrito como um complexo de 3 polipeptídeos, designados como subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Entretanto esse complexo não ocorre em outros tecidos do camundongo nem em outras espécies, onde somente a subunidade  $\beta$  é expressa, sendo a responsável pela atividade biológica do NGF. As funções das subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  na glândula salivar de camundongos ainda não estão esclarecidas, mas parecem relacionar-se com o metabolismo de calicreínas no órgão (MCDOLNAD et al., 1991; BRADSHAW et al., 1994).

O NGF tem ação bem determinada no SNC, agindo sobre os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, do caudado e do putamen. NGF é produzido no SNC tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta, principalmente por neurônios do hipocampo, cortex e regiões olfatórias, alvos de neurônios colinérgicos; embora células gliais, incluindo astrócitos e micróglia, também contribuam para essa produção. A expressão de NGF nessas regiões é marcadamente aumentada em situações de isquemia, hipoglicemia e lesão tecidual (LINDVALL et al., 1994; SOFRONIEW; HOWE;

MOBLEY, 2001; Barry et al., 2011). No SNP, a ação do NGF é exercida principalmente sobre neurônios simpáticos e neurônios sensitivos derivados da crista neural (JOHNSON et al., 1989; SCULLY & OTTEN, 1995). Mais recentemente, estudos demonstraram efeitos diretos de NGF sobre neurônios ganglionares parassimpáticos, que relacionam-se com a potencialização de sinapses e a indução de crescimento de neuritos (HAZARI; PAN; MYERS, 2007; WEIGAND; KWONG; MYERS, 2015). Periféricamente, órgãos alvo são a principal fonte de NGF e o transporte axonal retrógrado é considerada a principal forma de acúmulo de NGF pelos neurônios, e não a síntese pelo próprio corpo neuronal (KORSHING & THOENEM, 1983; HEUMANN et al., 1984; HEUMANN et al., 1987). Em casos de lesões nervosas periféricas, observa-se expressão diferenciada de NGF e seus receptores, por diferentes tipos celulares. Entre eles, aqueles do próprio sistema nervoso, como neurônios, células gliais satélites e células de Schwann; células estruturais do órgão ou tecido, incluindo células alvo da inervação (células epiteliais, células musculares, células endoteliais, entre outras) e fibroblastos; e ainda, células imunes, residentes ou infiltrantes (TERENGI, 1999; CAROLEO et al., 2001; MICERA et al., 2007; RICHNER et al., 2014).

As ações do NGF sobre neurônios incluem ativação, indução de diferenciação, sobrevivência e proliferação, regulação da sinapse e da síntese de neurotransmissores; além de possuir papel protetor em condições de degeneração. Além de suas ações originalmente definidas no sistema nervoso, vários outros papéis tem sido atribuídos ao NGF, entre eles participação em processos de proliferação e ativação celular (NICO et al., 2008; BLAIS et al., 2013), balanço energético (FARGALI et al., 2012) gametogênese (LINHER-MELVILLE; LI, 2013) e, de maneira notável, o papel de comunicador entre os sistemas nervoso e imune (ALOE; SIMONE; PROPERZI, 1999) (SCURI; SAMSELL; PIEDIMONTE, 2010; KRITASL et al., 2014; (ALOE et al., 2015).

NGF exerce suas funções via sua ligação com os receptores TrkA e p75. No caso do trkA, sua ativação pelo NGF leva à fosforilação de resíduos de tirosina no domínio citoplasmático celular, que por sua vez recruta moléculas e vias de sinalização múltiplas envolvendo PLC-g1, MAPK e PI3K. Essas vias de sinalização, em conjunto, medeiam as múltiplas ações NGF. Ainda, o receptor TrkA ligado ao NGF, juntamente com os intermediários de sinalização associados, é internalizado pela célula por mecanismos de

endocitose mediada por clatrina clássica ou macropinocitose. Os complexos NGF/TrkA endocitados parecem essenciais nas atividades do NGF, principalmente em neurônios, onde são transportados retrogradamente até o corpo neuronal e, dessa forma, propagam os sinais de diferenciação, sobrevivência e ativação, entre outros (HARRINGTON; GINTY, 2013; MARLIN; LI, 2015). Comparado ao TrkA, o papel funcional do p75 na sinalização pelo NGF é mais complexa e menos definida. Uma das atividades atribuídas ao p75 é a de aumentar a afinidade de NGF ao TrkA, por acelerar a taxa de associação dos mesmos; e de aumentar a especificidade de TrkA para NGF, por inibir sua interação com a neurotrofina 3. Ainda, é atribuída ao p75 sinalização independente de TrkA, que envolve a ativação de NF- $\kappa$ B e a fosforilação de c-Jun cinase, bem como produção aumentada de ceramida, levando à indução de morte celular programada. Entretanto a indução de morte celular por sinalização via p75 envolve mais sua interação com a forma imatura de NGF, o proNGF, com a forma madura da neurotrofina. Sabe-se que a ligação de p75 com NGF é de baixa afinidade, entretanto sua interação com proneurotrofinas é de alta afinidade (MISCHEL et al., 2001; HEMPSTEAD, 2002).

NGF é expresso no coração e sua presença correlaciona-se com a densidade de inervação simpática. Os níveis de NGF podem afetar não somente a sobrevivência dos nervos simpáticos, mas também a transmissão sináptica entre neurônios e cardiomiócitos (KORSCHING; THOENEN, 1983; KIMURA et al., 2010; GOVONI et al., 2011). Cardiomiócitos são capazes de sintetizar NGF e a interação entre NGF e seu receptor TrkA, de maneira autócrina ou parácrina, é de fundamental importância para a sobrevivência dessas células e preservação dos nervos cardíacos (IEDA et al., 2004; CAPORALI et al., 2008). Em condições experimentais de desnervação autonômica, seguida de regeneração, observa-se aumento na produção de NGF (BOON et al., 1984; KANAKIS et al., 1985; MARTINELLI et al., 2006). Por outro lado, níveis reduzidos de NGF constituem fator determinante da desregulação nos processos de armazenamento, liberação e recaptção de noradrenalina em terminações simpáticas no coração, implicados no estabelecimento de insuficiência cardíaca crônica (KAYE et al., 2000; KREUSSER et al., 2008; KIMURA et al., 2010). Foi demonstrado que a expressão de NGF por cardiomiócitos é reduzida em situações de estresse mecânico, o que levaria à supressão do crescimento de axônios simpáticos (RANA et al., 2009). Ainda, foi demonstrado, em modelos experimentais de insuficiência cardíaca, que a indução de expressão aumentada de NGF no coração previniu o desenvolvimento de processos



neuropáticos, como isquemia (IEDA & FUKUDA, 2009) e dilatação ventricular (MELONI et al., 2010). Interessante, a expressão de p75 também foi demonstrada em coração, porém a mesma parece ocorrer principalmente em células intersticiais do miocárdio. A expressão de p75 no coração é relacionada com sua inervação simpática (ZHOU et al., 2004; YUAN; HUANG; HUANG, 2012) e com processos degenerativos dessa inervação que ocorrem após infarto (LORENTZ et al., 2013).

Na infecção com *Trypanosoma cruzi*, foi verificado, em modelo experimental da doença, que os níveis cardíacos de NGF estão aumentados na fase aguda da infecção, período onde a desnervação autonômica é importante no órgão (MARTINELLI et al., 2006). Interessante, em cultura de células cardíacas, verificou-se que a interação do *T. cruzi* com receptores TrkA em fibroblastos desencadeou elevada expressão de NGF, o que favoreceu resposta positiva de cardiomiócitos à eventos de estresse oxidativo. Foi sugerido que esse seria um mecanismo desencadeado pelo parasito para favorecer sua permanência no coração na fase crônica da infecção (ARIDGIDES; SALVADOR; PEREIRAPERRIN, 2013).

### ***BDNF***

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é o segundo membro da família das neurotrofinas, purificado do cérebro de porco em 1982 (BARDE; EDGAR; THOENEN, 1982). O gene para BDNF é constituído de pelo menos oito promotores distintos, que iniciam a transcrição de múltiplos RNAm. Embora até 18 transcritos possam ser produzidos, todos codificam uma única proteína madura de BDNF, de forma que é sugerido que esta complexa organização transcricional deva estar relacionada com diferentes níveis de regulação ou diferentes localizações subcelulares do BDNF ou de seus RNAm. Assim como o NGF, BDNF é secretado tanto na sua forma precursora, pró-BDNF, como na sua forma madura (AID ET AL., 2007; PRUUNSILD ET AL., 2007; GREENBERG ET AL., 2009; BEGNI; RIVA; CATTANEO, 2016).

BDNF, juntamente com seu receptor TrkB, é a neurotrofina mais amplamente expressa no SNC. Produzida principalmente por neurônios, ocorre em maior abundância no hipocampo e córtex cerebral, mas está presente também no tálamo e hipotálamo, bulbo olfatório, amígdala, cerebelo e medula espinhal (CONNER et al., 1997). As funções do BDNF no SNC estão bem definidas, entre elas suas ações nos processos de diferenciação neuronal a partir de células tronco, indução de crescimento axonal e dendrítico de neurônios, formação e maturação de sinapses glutamatérgicas e

GABAérgicas e o refinamento de conexões sinápticas, como potenciação a longo termo (LTP), que se relacionam com, entre outras funções, aprendizagem e formação de memória (BRAMHAM; MESSAOUDI, 2005); GOTTMANN; MITTMANN; LESSMANN, 2009; MINICHIELLO, 2009; (EDELDMANN; LESSMAN; BRIGADSKI, 2013; EDELDMANN; LESSMAN; BRIGADSKI, 2013; PARK; POO, 2013). Importante, alterações na expressão e função de BDNF estão envolvidas em uma série de distúrbios psiquiátricos, tais como estresse, depressão e esquizofrenia, além de distúrbios neurodegenerativos como Parkinson e Alzheimer, entre outros. Em função de seu envolvimento nessas doenças, BDNF tem sido apontado como possível alvo para tratamentos farmacológicos e não farmacológicos das mesmas (HE et al., 2013; BEGNI; RIVA; CATTANEO, 2016; TANILA, 2016).

Fora do SNC, plaquetas constituem a maior fonte de BDNF. Elas não somente sintetizam o fator, como também são capazes de estocar BDNF secretado por outros tecidos (YAMAMOTO; GURNEY, 1990; FUJIMURA et al., 2002). Além de plaquetas, BDNF e seu receptor de alta afinidade TrkB são também expressos em vários outros tecidos não neuronais e órgãos, incluindo músculos esquelético e liso, coração, fígado, rins e pulmão (MAISONPIERRE et al., 1991; HILTUNEN et al., 2001; COPRAY et al., 2000). Ainda, BDNF é produzido por células inflamatórias, entre elas monócitos, linfócitos e eosinófilos (KERSCHENSTEINER et al., 1999); NOGA et al., 2003; CHAN et al., 2015). As ações do BDNF sobre o sistema nervoso periférico são descritas. BDNF é expresso por e modula as funções de neurônios autonômicos e sensoriais (LUTHER; ENES; BIRREN, 2012; ALZOUBI et al., 2013; ARIAS et al., 2014; HAYAKAWA et al., 2014). Além disso, vários estudos descrevem a participação de BDNF em processos de degeneração e regeneração de nervos periféricos (VÖGELIN et al., 2006; LYKISSAS et al., 2007; GAO et al., 2016; YI et al., 2016). Além de suas funções neuroprotetoras e neuroregenerativas nos tecidos e órgãos periféricos (COPRAY et al., 2000; VÖGELIN et al., 2006; MARCOL et al., 2007; GAO et al., 2016), vários estudos têm implicado BDNF em fenômenos não neuronais, incluindo metabolismo energético (VERGE et al., 2014), inflamação (LINKER et al., 2010) e angiogênese (DONOVAN et al., 2000; FOUDA et al., 2016). Por fim, BDNF e seus receptores apresentam expressão alterada em diversas condições patológicas periféricas (VERGE et al., 2014; WATANABE et al., 2015; WILASCO et al., 2016). De maneira importante, BDNF está presente no sangue de roedores e humanos e tem sido, inclusive,

proposto como marcador periférico de algumas doenças, não somente periféricas, mas também centrais (LASKE et al., 2006; DINIZ; TEIXEIRA, 2011, MARTINELLI et al., 2011; WILASCO et al., 2016).

À semelhança do que ocorre com NGF, as ações do BDNF são determinadas via sua interação com o receptor de alta afinidade, no caso *trkB*, e com o receptor de baixa afinidade *p75*. A ligação de BDNF ao *TrkB* resulta em fosforilação intracelular e ativação de cascatas de sinalização, que incluem proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfolipase C- $\gamma$  (PLC-  $\gamma$ ) e fosfoinositol-cinase 3 (PI3K). Estas vias levam à sobrevivência celular, inativam sinais pró-apoptóticos e promovem neurogênese (PARK; POO, 2013; GONZALEZ et al., 2016; BEGNI; RIVA; CATTANEO, 2016). BDNF também medeia sobrevivência e ativação de células endoteliais, através da interação com *TrkB* (KERMANI et al., 2005). A associação de BDNF com *p75*, da mesma forma que com NGF, parece favorecer sua sinalização via *TrkB*. Além disso, BDNF parece mediar, via *p75*, a degeneração de nervos simpáticos (SINGH et al., 2008; LORENTZ et al., 2013). Por outro lado, *p75* apresenta grande afinidade por pró-BDNF, e essa interação relaciona-se principalmente com a indução de morte celular (HEMPSTEAD, 2015; BEGNI ET AL., 2016; GONZALEZ ET AL., 2016).

No coração, BDNF está envolvido com o controle de sua transmissão autonômica (YANG; SLONIMSKY; BIRREN, 2002) e exerce efeitos proeminentes sobre a angiogênese no órgão (DONOVAN et al., 2000; FOUUDA et al., 2016). Foi demonstrado que a expressão de BDNF no coração é constitutiva e está relacionada, via seu receptor *TrkB*, com manutenção da função normal de cardiomiócitos. BDNF, em paralelo com o controle adrenérgico, atua sobre os processos de contração e relaxamento cardíaco (FENG et al., 2015). Além disso, BDNF e seus receptores são relacionados a processos patológicos no coração. A expressão de RNAm para o BDNF aumentou em cardiomiócitos após indução de isquemia no miocárdio (HILTUNEN et al., 2001). Estudos recentes mostram que a interação de BDNF com seu receptor *p75* está envolvida no processo de desnervação simpática que ocorre após o infarto (LORENTZ et al., 2013). O receptor *TrkB* também tem sido envolvido na disfunção cardíaca. De acordo com o trabalho de Fulgenzi e colaboradores (2015), a deleção de *TRkB* no coração desregula a sinalização por cálcio e leva ao desenvolvimento de cardiopatia, com redução da parede e dilatação ventricular.

No que se refere à doença de Chagas não existem, até o momento, estudos sobre a expressão de BDNF e seus receptores no coração de pacientes chagásicos ou de modelos experimentais da doença. Um único trabalho relacionado é o de Martinelli e colaboradores (2011), que mostraram que níveis séricos de BDNF estão elevados em pacientes com cardiopatia chagásica. Os autores sugeriram uma relação entre os altos níveis de BDNF no sangue e a desnervação autonômica que ocorre nesses pacientes.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando a relevância social da doença de Chagas na América Latina, em especial da cardiopatia chagásica, é crucial o esclarecimento dos fatores envolvidos no desenvolvimento da disfunção cardíaca, incluindo aqueles relacionados à desnervação autônoma. Ratos infectados com *T. cruzi* constituem bom modelo para a fase indeterminada da doença, que tem sido cada vez mais considerada, em função de sua importância na evolução das formas clínicas da doença. Em vista da ausência de estudos sistematizados sobre o processo lesivo das terminações nervosas autônomas cardíacas, e da participação de neurotrofinas durante a infecção com *T. cruzi*, torna-se importante um estudo que aborde esses aspectos e correlacione-os com os aspectos funcionais da cardiopatia chagásica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Em coração de ratos infectados experimentalmente com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e em coração de ratos controles, caracterizar ultraestruturalmente as terminações nervosas autônomas e analisar a expressão de NGF, BDNF e seus receptores TrkA, TrkB e p75, correlacionando essa expressão com a desnervação autonômica cardíaca.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Em ratos infectados experimentalmente com cepa Y de *T. cruzi*, aos 13, 20, 30 e 60 dias após infecção, e em seus respectivos controles, pretende-se:

1. Avaliar, por imunomarcagem da proteína de neurofilamento-M (NF-M), a densidade de fibras nervosas no tecido cardíaco;
2. Analisar, por microscopia eletrônica de transmissão, as características ultraestruturais do tecido cardíaco, com ênfase nas terminações nervosas autonômicas;
3. Quantificar, pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), os níveis cardíacos e séricos das neurotrofinas NGF e BDNF;
4. Avaliar, por imunofluorescência, a expressão dos receptores TrkA, TrkB e p75 no tecido cardíaco;
5. Correlacionar os níveis de neurotrofinas e a expressão de seus receptores com o processo de desnervação e reinervação autonômica cardíaca que ocorre ao longo da infecção chagásica.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman machos, obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Os animais foram desmamados com 21 dias de idade e a partir de então foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia, (ICB-UFMG), sob condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso à água e ração. Aos 28 dias de idade, os animais, com peso médio de 50g, foram distribuídos em dois grupos, controle e infectado com cepa Y de *T. cruzi*. Os seguintes subgrupos foram estabelecidos para eutanásia (figura 01):

- 41 dias, idade correspondente a 13 dias de infecção, fase aguda;
- 48 dias, idade correspondente a 20 dias de infecção, fase aguda;
- 58 dias, correspondentes a 30 dias de infecção, fase crônica;
- 88 dias, correspondente a 60 dias de infecção, fase crônica.

Para as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência, foram utilizados 6 animais para cada um dos subgrupos, 3 infectados e 3 controles. Para a técnica de ELISA, foram utilizados 10 animais para cada um dos subgrupos, 5 infectados e 5 controles. Todos os procedimentos realizados com os animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo nº 340/2014 (Anexo 1).

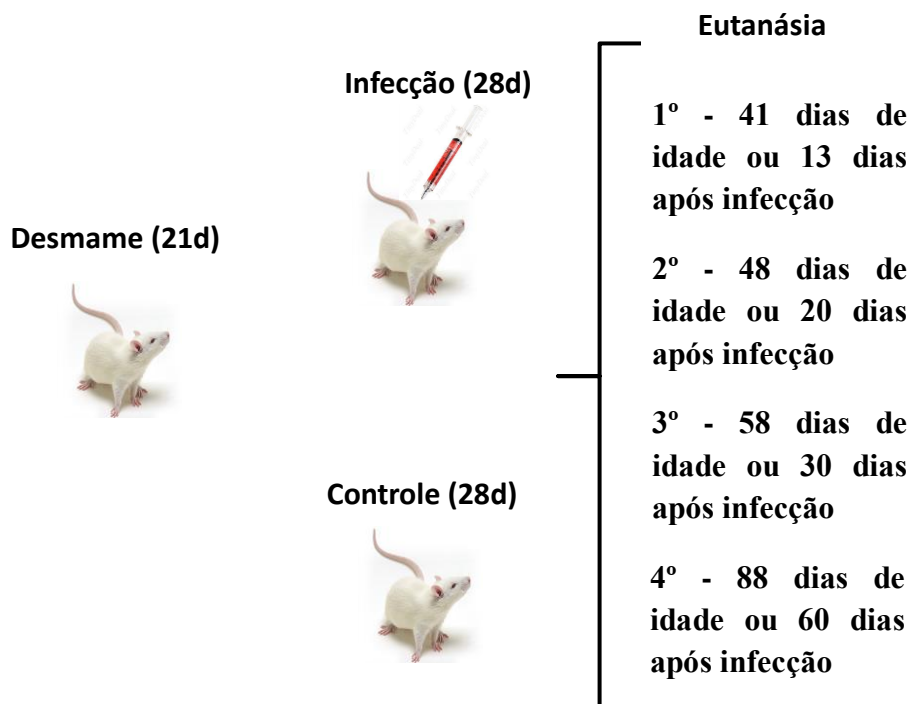


Figura 01: Delineamento experimental

#### 4.2 Infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*

A infecção experimental foi realizada pelo técnico Afonso da Costa Viana, no laboratório de Biologia dos Tripanossomas, chefiado pelo Prof. Dr. Egler Chiari, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. Os ratos foram inoculados intraperitonealmente com 300.000 tripomastigotas/50g de peso corporal da cepa Y de *T. cruzi* (SILVA & NUSSSENSWEIG, 1953). O controle da infecção foi feito pela observação sob microscópio óptico de tripomastigotas em gota espessa de sangue, obtida da cauda de animais com dez a doze dias de infecção.

#### 4.3 Morte dos animais e colheita do material

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 2,2,2-tribromoetanol (25mg /100g de peso). A caixa torácica foi aberta, com exposição do coração. Para estudo ultraestrutural, foi realizada perfusão transcardíaca com solução salina (volume de aproximadamente 30% do peso corporal), para lavagem de sangue do sistema circulatório, seguida de solução fixadora de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965) em tampão fosfato 0,1M pH 7,2, contendo 4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído (volume de aproximadamente 60% do peso corporal).



Para o método de imunofluorescência, amostras de tecido cardíaco fresco foram colhidas e imersas, por uma noite, em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2.

Para a dosagem de proteínas (ELISA), as amostras de tecido cardíaco foram colhidas frescas e armazenadas em freezer -80°C até o momento do processamento.

#### **4.4 Método de imunofluorescência - detecção da proteína de neurofilamento M (NF-M) e dos receptores de neurotrofinas**

Amostras de ventrículo direito foram imersas em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, por uma noite. Em seguida, as amostras foram lavadas no mesmo tampão, sem o fixador, e imersas em solução de sacarose (Merck, Alemanha) 20% em tampão fosfato, por uma noite, a 4°C. As amostras foram então imersas em meio criopreservante (Tissue-Tek O.C.T.- Optimal Cutting Temperature, USA) e congeladas em nitrogênio líquido. Secções de 7µm de espessura foram obtidas em criostato à -20°C (Leica CM3040 S), disponível no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As secções foram colhidas em lâminas silanizadas (silano a 2% em acetona), mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e então secadas em corrente de ar frio durante 30 minutos. Para a imunomarcção, as secções foram imersas em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4, por 20 minutos, e então incubadas com tampão de bloqueio de ligações inespecíficas (albumina de soro bovino – BSA - a 1% e Tween 20 a 0,01% em tampão PBS, pH 7,4, por 1 hora. Em seguida, as secções foram lavadas em PBS e incubadas, por uma noite, com anticorpo anti-NGFR p75 (mouse monoclonal-53631-Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), ou anti-TrkA (rabbit polyclonal-ab76291- Abcam, MA, USA), ou anti-TrkB (rabbit polyclonal – SC 119- Santa Cruz Biotechnology), ou anti-NF-M (mouse monoclonal– AB 2314897 - Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA), todos na diluição 1:100 em PBS. As secções foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos cada com tampão PBS, e procedeu-se com a revelação por incubação, por uma hora, com anticorpos anti-espécies dos anticorpos primários, conjugados a Alexa Fluor 546 (donkey anti-mouse IgG ou donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Oregon, USA), diluídos a 1:1000 v/v em PBS. As secções foram novamente lavadas em tampão PBS e montadas com lamínula sobre solução de 90% glicerol/10% de tampão Tris 1M, pH 9,0. Todo o procedimento foi realizado em câmara úmida e à temperatura ambiente, exceto a

etapa de incubação com os anticorpos primários, que aconteceu a 4°C. As secções foram analisadas e fotografadas sob microscópio de fluorescência Axioplan 2 da Zeiss, equipado com HBO 100 lâmpada W mercúrio, localizado no laboratório de Neurobiologia (ICB/UFMG). Foram avaliadas secções de ventrículo direito de 3 animais por tempo de infecção e seus respectivos controles.

#### **4.5 Microscopia eletrônica de transmissão - análise ultraestrutural das terminações nervosas no coração**

Após perfusão transcardíaca com solução fixadora de Karnovsky modificada (Karnovsky, 1965: tampão fosfato 0,1M pH 7,2, contendo 4% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído), amostras de ventrículo direito, com 1-2mm, foram imersas no mesmo fixador, por uma noite. As amostras foram posteriormente transferidas para a solução tampão e então incubadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão, por 2 horas. À solução de ósmio foi adicionado ferrocianeto de potássio na concentração 1,6% (solução de tetróxido de ósmio reduzido) para evidenciar membranas celulares. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1M à temperatura ambiente, por três vezes, sendo cada uma delas por dez minutos. Os fragmentos de tecido cardíaco foram imersos em solução aquosa de acetato de uranila a 2% e sacarose a 13,3%, por uma noite à 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água destilada por três vezes, dez minutos cada. Procedeu-se com o processo de desidratação das mesmas por passagem em concentrações crescentes de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%; MERCK, Alemanha), seguida de imersão em dois banhos de acetona pura (MERCK), por 10 minutos cada, todo o processo à temperatura ambiente. Seguiu-se com a etapa de infiltração progressiva em resina do tipo Epon (Electron Microscopy Sciences, EUA), por passagem em banhos da resina, sem o polimerizador, diluída em acetona nas proporções: 1:2, 1:1 e 2:1 (1 hora cada para as duas primeiras diluições e por uma noite para a terceira). A última etapa de infiltração e a inclusão das amostras foram feitas em resina hidrofóbica do tipo Epon contendo o polimerizador DMP-30. A infiltração foi feita por imersão na resina por 2 horas à temperatura ambiente e a inclusão por disposição das mesmas na resina em moldes de silicone, seguida de incubação em estufa a 40° C por uma hora e a 60° C por, no mínimo, 48 horas, para polimerização. Os blocos contendo as amostras obtidos foram desbastados com navalha de aço sob lupa e cortados em ultramicrótomo Leica EM UC6, com navalha de vidro, para obtenção de cortes semifinos, com espessura de 300nm. Os

cortes semifinos, colhidos em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina, foram avaliados sob microscópio óptico, para escolha da área de interesse de estudo. Apesar da impossibilidade de visualização das terminações nervosas no tecido cardíaco pela microscopia óptica, procurou-se delimitar campos com maior área de interstício conjuntivo preservado no miocárdio, regiões com maior potencial para identificação das terminações pela microscopia eletrônica (Fig. 03). A partir dessa análise, procedeu-se com a ultramicrotomia com navalha de diamante, obtendo-se cortes ultrafinos (50-60nm), os quais foram colhidos em telas de cobre de 300 mesh e contrastados por adição de solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963). A contrastação foi feita em placa de Petri previamente revestida com parafilm e contendo pastilhas de NaOH. Foram depositadas gotas da solução contrastante e as telas contendo os cortes foram depositadas sobre as gotas, com os cortes voltados para as mesmas, por cinco minutos, seguido de lavagem em água isenta de CO<sub>2</sub> e secagem em papel de filtro. Após contrastados, os cortes ultrafinos foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão (SpiritBiotwin FEI – 120 kV). Para a análise ultraestrutural foram utilizados 3 animais para cada tempo de infecção e seus respectivos controles. Para cada animal, foram preparados 10 fragmentos de diferentes regiões do ventrículo direito, com obtenção de uma tela por fragmento, contendo, em média, 4 cortes ultrafinos.

O processamento e análise das amostras foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG.

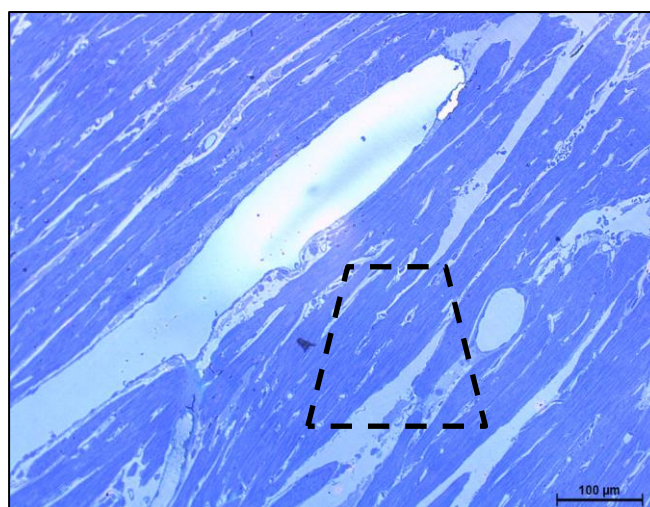


Figura 03: Fotomicrografia de miocárdio do ventrículo direito de rato, com indicação de área de interesse para obtenção de cortes ultrafinos. Corte semifino corado com azul de toluidina.

## 4.6 Quantificação dos níveis de NGF e BDNF por ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) –

### 4.6.1 Tecido cardíaco

Para obtenção dos níveis de NGF e BDNF no ventrículo direito foram utilizados os kits e protocolos de ELISA para dosagem de NGF e para BDNF da *R&D Systems* (Minneapolis, EUA). Amostras de ventrículos direitos foram submersas em 750µl de solução de lise (Tris-Base 50mM, NaCl 100mM, EDTA-2Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 5mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Nonideto P40 1%, Triton x100 0,30%, Deoxicolato de sódio 0,5%, NaF 20mM), juntamente com os inibidores de proteases fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 1 mM; benzamidina 1 mM; aprotinina A 1µM, ortovanadato de sódio 1mM e pepstatina A 1µM. O tecido foi então macerado por um homogeneizador ultrasônico durante o período de um minuto ininterrupto, por três vezes, com intervalos de 9 minutos. Após a maceração, o homogeneizado resultante foi centrifugado a 8.000 rotações por minuto (rpm), a 4 °C, durante 12 minutos. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado em freezer -80° C até utilização para o ensaio imunoenzimático. Resumidamente, anticorpos de captura específicos foram diluídos conforme recomendações do kit e adicionados às placas de 96 poços (Thermo Scientific Nunc, USA), as quais foram mantidas por uma noite a 4° C. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem (PBS / Tween 0,1%) e o bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado pela adição aos poços, por 2 horas, à temperatura ambiente, de solução de PBS / BSA 1%. Após três lavagens, as placas foram incubadas com as amostras diluídas em PBS (diluição de 1:3), por 2 horas a 4° C. As placas foram lavadas quatro vezes e então incubadas com anticorpos de detecção (diluídos conforme recomendações do kit) durante duas horas em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após 4 lavagens, adicionou-se solução de estreptavidina fornecida pelo kit, por 30 minutos, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e incubadas com solução de substrato contendo ortofenildiamina (OPD, Sigma) por 30 minutos ao abrigo de luz. A reação foi interrompida adicionando-se solução de ácido sulfúrico 1N (Merck). A densidade óptica foi quantificada com o uso do espectrofotômetro (Status - labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil), utilizando-se comprimento de onda de 490 nm. Para cada placa, foi realizada curva padrão do fator quantificado. Ainda, foram utilizados poços controles, sem adição das amostras.

Os níveis de proteína total nas amostras foram determinados de acordo com o método de Bradford (1976) e os níveis de neurotrofinas foram expressos como picogramas de neurotrofina por miligrama de proteína total (pg/mg).

Para a quantificação das neurotrofinas, foram utilizados coração de 5 animais por tempo de infecção e seus respectivos controles.

#### **4.6.2 Sangue**

Para a análise dos níveis séricos de NGF e BDNF, foram colhidas amostras de sangue (cerca de 5 ml). Para obtenção do soro, as amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos para coleta de sangue (Labor Import, Brasil) sem aditivos e deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos, para formação do coágulo. A seguir, as amostras foram transferidas para geladeira, a 4°C, por 20 minutos para consolidação do coágulo, após o que foram centrifugadas (centrífuga Jouan BR4i) a 2.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O soro foi colhido, separado em alíquotas e estocado a -80°C. A dosagem das neurotrofinas foi realizada da mesma forma que a descrita para a dosagem das mesmas no tecido muscular, utilizando mesmos kits e protocolos. Os níveis séricos de neurotrofinas foram expressos como pictogramas de neurotrofina por mililitro de soro (pg/ml). O restante do processamento foi feito de acordo com o protocolo anterior (o mesmo para amostras de tecido) para ELISA. Para a quantificação das neurotrofinas, no sangue foram utilizados 5 animais por tempo de infecção e seus respectivos controles.

#### **4.7 Método Estatístico**

Para todos os grupos analisados quantitativamente, foi aplicado o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Uma vez que as amostras não passaram no teste de normalidade, foi utilizado, para todas as análises estatísticas, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparação múltipla de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . O software usado foi o Prisma 5 para Mac OS.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Densidade de fibras nervosas no ventrículo direito**

No miocárdio do ventrículo direito de animais controles, a imunomarcagem da proteína de neurofilamento-M permitiu a visualização de fibras nervosas abundantes no interstício, acompanhando o percurso das fibras musculares cardíacas (Figura 3A). Não foram observadas diferenças na inervação do miocárdio entre animais controles de diferentes idades. A omissão do anticorpo primário aboliu toda a fluorescência (Figura 3B).

Nos animais com 13 e 20 dias de infecção, a densidade de fibras nervosas mostrou-se bastante reduzida e heterogênea. Em algumas áreas, observou-se a presença de poucas fibras nervosas, enquanto na maior extensão do miocárdio a desnervação foi total. Troncos nervosos, constituídos por feixes de fibras fluorescentes puderam ser vistos no miocárdio, em ambos os tempos de infecção (Figuras 3C e 3D). Aos 30 dias de infecção, a densidade de fibras mostrou-se maior que nos períodos anteriores de infecção, mas sem alcançar o padrão observado nos animais controles (Figura 3E). Aos 60 dias de infecção, o miocárdio dos animais apresentou densidade de fibras nervosas maior do que aquela observada aos 30 dias, mas ainda menor do que a vista nos animais controles (Figura 3F).

### **5.2 Ultraestrutura do miocárdio, com ênfase nas terminações nervosas autonômicas cardíacas**

A análise ultraestrutural do miocárdio do ventrículo direito de animais controles mostrou morfologia padrão da musculatura cardíaca de mamíferos. Cardiomiócitos apresentaram miofibrilas, mitocôndrias e demais organelas celulares com morfologia clássica. No conjuntivo intermuscular, puderam ser observados, além de células e fibras típicas do tecido conjuntivo, abundantes feixes nervosos e vasos sanguíneos (Figuras 4A e 4B). As terminações nervosas autonômicas, ou varicosidades, foram identificadas como dilatações de axônios, com diâmetro maior que 500 nanômetros, e com vesículas de neurotransmissor em seu interior. O diâmetro dos axônios entre varicosidades não excedeu 500nm (Figuras 5A e 5B). Varicosidades puderam ser vistas em diferentes associações com as células de Schwann. Algumas eram totalmente envolvidas pelo seu citoplasma, outras parcialmente envolvidas e, mais raramente, as varicosidades eram

totalmente desprovidas de envolvimento pelas células de Schwann. Foram identificadas dois tipos de varicosidades, as do tipo I e as do tipo II. As do tipo I, correspondentes a terminações colinérgicas, apresentavam grande quantidade de pequenas vesículas agranulares, de diâmetro entre 40 e 60nm, podendo apresentar, em número bem menor e nem sempre visíveis no corte, grandes vesículas granulares, com diâmetro maior que 80nm (Figura 6A). As varicosidades do tipo II, correspondentes a terminações noradrenérgicas, caracterizaram-se pela presença predominante de pequenas vesículas, de diâmetro entre 40 e 60nm, tanto granulares quanto agranulares. O aspecto das vesículas pequenas granulares foi heterogêneo, com o núcleo eletrondenso variando desde um ponto central até a ocupação de quase toda a vesícula. Como nas varicosidades do tipo I, foram observadas, também, em número bem menor, vesículas granulares grandes, com diâmetro maior que 80nm (Figura 6B).

Ao analisar-se o miocárdio do ventrículo de animais infectados, diferentes alterações foram observadas. Embora a maioria dos cardiomiócitos apresentasse morfologia semelhante à vista nos animais controles, nos animais com 13 e 20 dias de infecção, alguns cardiomiócitos apresentavam morfologia alterada, que incluiu o espaçamento entre miofibrilas e a presença de mitocôndrias com aspecto modificado. Ninhos de parasitos puderam ser observados no citoplasma de alguns cardiomiócitos (Figuras 7A e 7B). A presença de células inflamatórias no interstício também foi notável, ressaltando a grande frequência de macrófagos. Estes foram vistos, muitas vezes, contendo parasitos em seu interior (Figuras 8A e 8B). Nesses períodos de infecção, as varicosidades autonômicas foram raras no interstício e as que puderam ser observadas apresentaram vários sinais de degeneração, como rarefação de vesículas de neurotransmissor, mitocôndrias alteradas e presença de corpos densos. Em função da rarefação de vesículas, não foi possível a distinção, na maioria das vezes, entre os tipos I e II de varicosidades (Figuras 9A e 9B). A quantificação de vesículas de neurotransmissores mostrou redução significativa das mesmas em varicosidades do miocárdio de animais com 13 e 20 dias de infecção (Gráfico 01). Aos 30 e 60 dias de infecção não foram mais observados parasitos intracelulares nas secções ultrafinas examinadas e a frequência de células inflamatórias tornou-se bastante reduzida. Quanto às varicosidades autonômicas, puderam ser observadas tanto varicosidades com sinais degenerativos quanto varicosidades com morfologia normal (Figuras 9A, 9B, 10A e 10B).

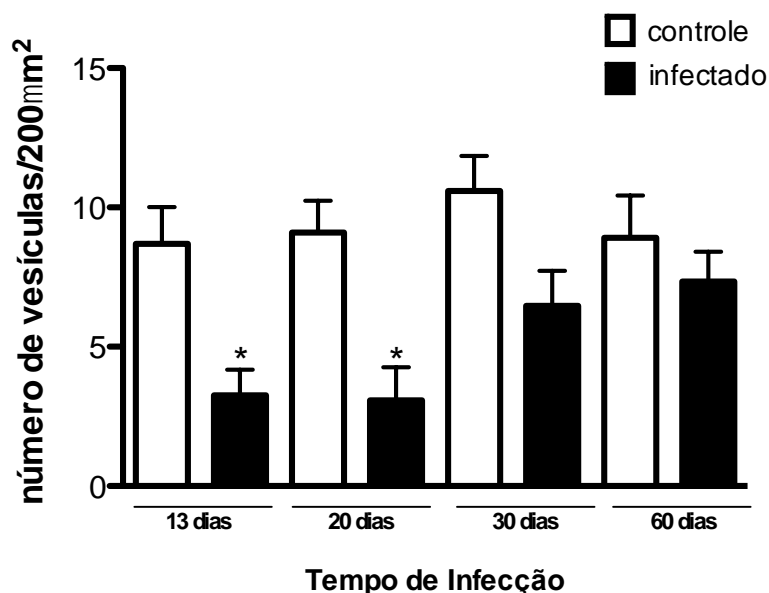


Gráfico 01: Número de vesículas de neurotransmissores por área de varicosidade autonômica. \*  $p < 0,05$ , infectado versus controle. Kruskal-Wallys, seguido de teste de múltipla comparação de Dunn.

### 5.3 Níveis cardíacos de NGF e BDNF

NGF foi detectado no coração de todos os grupos de animais analisados, controles e infectados. Em todos os grupos, os níveis cardíacos de NGF foram estatisticamente semelhantes entre si, exceto pelos animais com 20 dias de infecção, os quais apresentaram níveis do fator significativamente aumentados quando comparados aos dos animais controles (Gráfico 02). Com relação ao BDNF, o fator também foi detectado no coração de todos os animais, controles e infectados, e não houve diferença significativa entre os diferentes grupos e tempos de infecção (Gráfico 03).



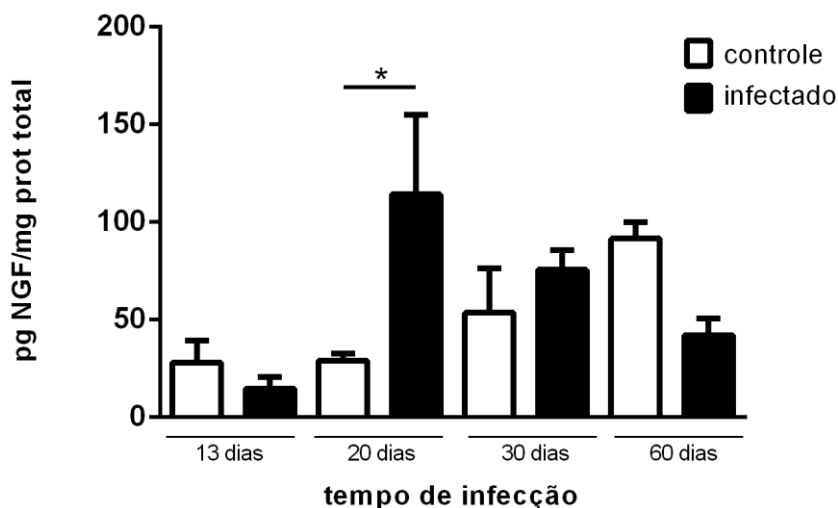


Gráfico 02: Níveis cardíacos de NGF no ventrículo direito de ratos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e seus controles. \*  $p < 0,05$ . Kruskal-Wallis, seguido de teste de múltipla comparação de Dunn.

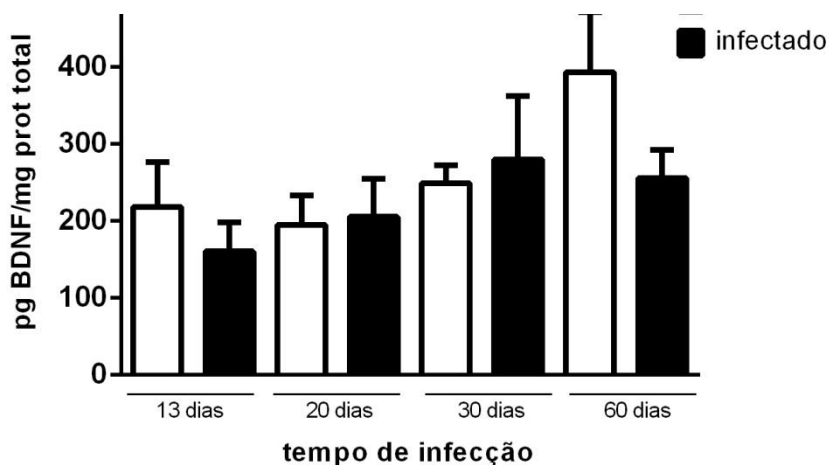


Gráfico 03: Níveis cardíacos de BDNF no ventrículo direito de ratos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e seus controles. \*  $p < 0,05$ . Kruskal-Wallis, seguido de teste de múltipla comparação de Dunn.

#### 5.4. Níveis séricos de NGF e BDNF

NGF foi detectado no soro de todos os grupos analisados, controles e infectados. Os níveis séricos de NGF foram semelhantes em todos os grupos analisados, exceto nos animais com 13 dias de infecção, cujos níveis foram significativamente maiores em relação àqueles dos demais grupos experimentais (Gráfico 4). BDNF também foi detectado no soro de todos os grupos de animais analisados. Diferenças significativas

nos níveis séricos do fator foram observadas aos 13 e 20 dias após infecção, quando se mostraram reduzidos em relação aos demais grupos (Gráfico 5).

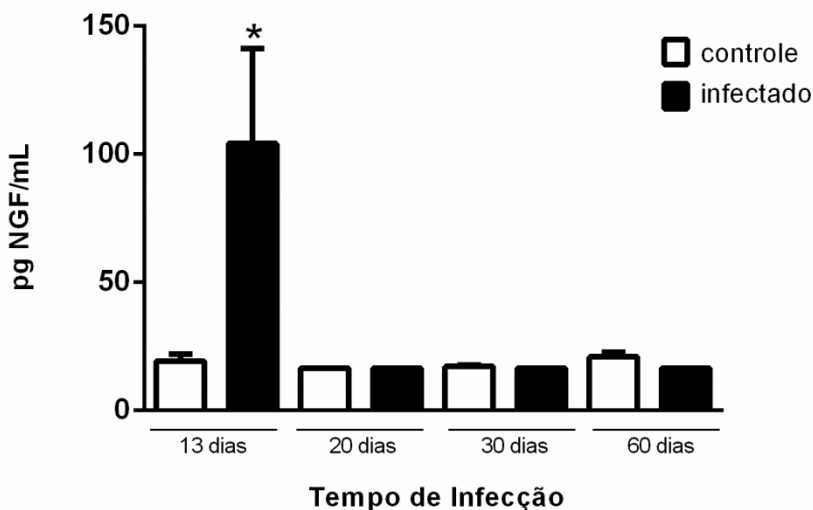


Gráfico 4: Níveis séricos de NGF em ratos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e seus controles. \* $p < 0,05$ . Kruskal-Wallis, seguido de teste de múltipla comparação de Dunn.

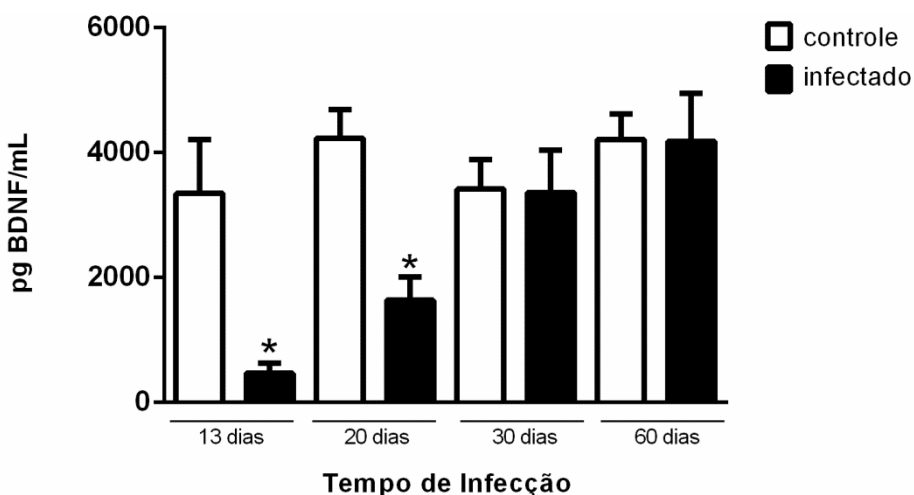


Gráfico 5: Níveis séricos de BDNF em ratos infectados pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi* e seus controles. \* $p < 0,05$ , infectado versus controle. Kruskal-Wallis, seguido de teste de múltipla comparação de Dunn.

### 5.5 Expressão dos receptores TrkA, TrkB e p75 no ventrículo direito

O miocárdio dos ventrículos de animais controles, de todas as idades, mostrou-se levemente imunorreativo para o receptor TrkA (Figura 12A), enquanto a omissão do anticorpo primário aboliu toda a imunofluorescência (Figura 12B). Aos 13 dias de infecção, o miocárdio mostrou aumento na fluorescência, porém mais forte em áreas

coincidentes com a presença de endotélio vascular (Figura 12C). Aos 20 dias de infecção, a imunoreatividade para TrkA mostrou-se mais forte e difusa por todo o miocárdio, incluindo cardiomiócitos, endotélio e, possivelmente, demais elementos intersticiais (Figura 12D). Aos 30 e 60 dias após infecção, a imunofluorescência mostrou-se semelhante àquela vista no miocárdio de animais controles (Figuras 12E e 12F).

Para o receptor TrkB, o ventrículo de animais controles não se apresentou imunoreativo (Figura 13A), o mesmo acontecendo após a omissão do anticorpo (Figura 13B). Quanto aos animais infectados, somente aos 30 dias de infecção foi possível observar imunofluorescência para TrkB, a qual se mostrou difusa em todo o miocárdio. Nos demais tempos de infecção, não foi observada imunoreatividade, semelhante ao visto no ventrículo de animais controles (Figuras 13C, 13D, 13E e 13F).

Para o receptor p75, o ventrículo de animais controles também não foi imunoreativo (Figura 14A), o mesmo ocorrendo após omissão do anticorpo primário (Figura 14B). Aos 13 dias de infecção, não foi observada diferença na imunoreatividade do ventrículo, quando comparada ao de animais controles (Figura 14C). Por outro lado, ventrículo de animais com 20 dias de infecção apresentou forte imunofluorescência para o receptor, mais localizada em áreas correspondentes ao estroma (Figura 14D). Aos 30 e 60 dias de infecção, não foi observada imunofluorescência, de maneira semelhante ao visto no ventrículo de animais controles (Figuras 14E e 14F).

Figura 3. Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Imunofluorescência para proteína M de neurofilamento. A- animal controle com 41 dias de idade. Observar numerosas fibras nervosas fluorescentes entre fibras musculares; B- controle da técnica por omissão do anticorpo primário; C e D- animais com 13 e 20 dias de infecção, respectivamente. Observar redução na densidade de fibras nervosas fluorescentes; seta em D indica tronco nervoso; E- animal com 30 dias de infecção. À direita da imagem observar área de regeneração com fibras nervosas fluorescentes. Asterisco indica área de desnervação total ocupando maior extensão do corte. F- animal com 60 dias de infecção. Observar presença de fibras nervosas em todo o corte, porém com menor densidade quando comparada ao controle (A). Barra= 50µm.

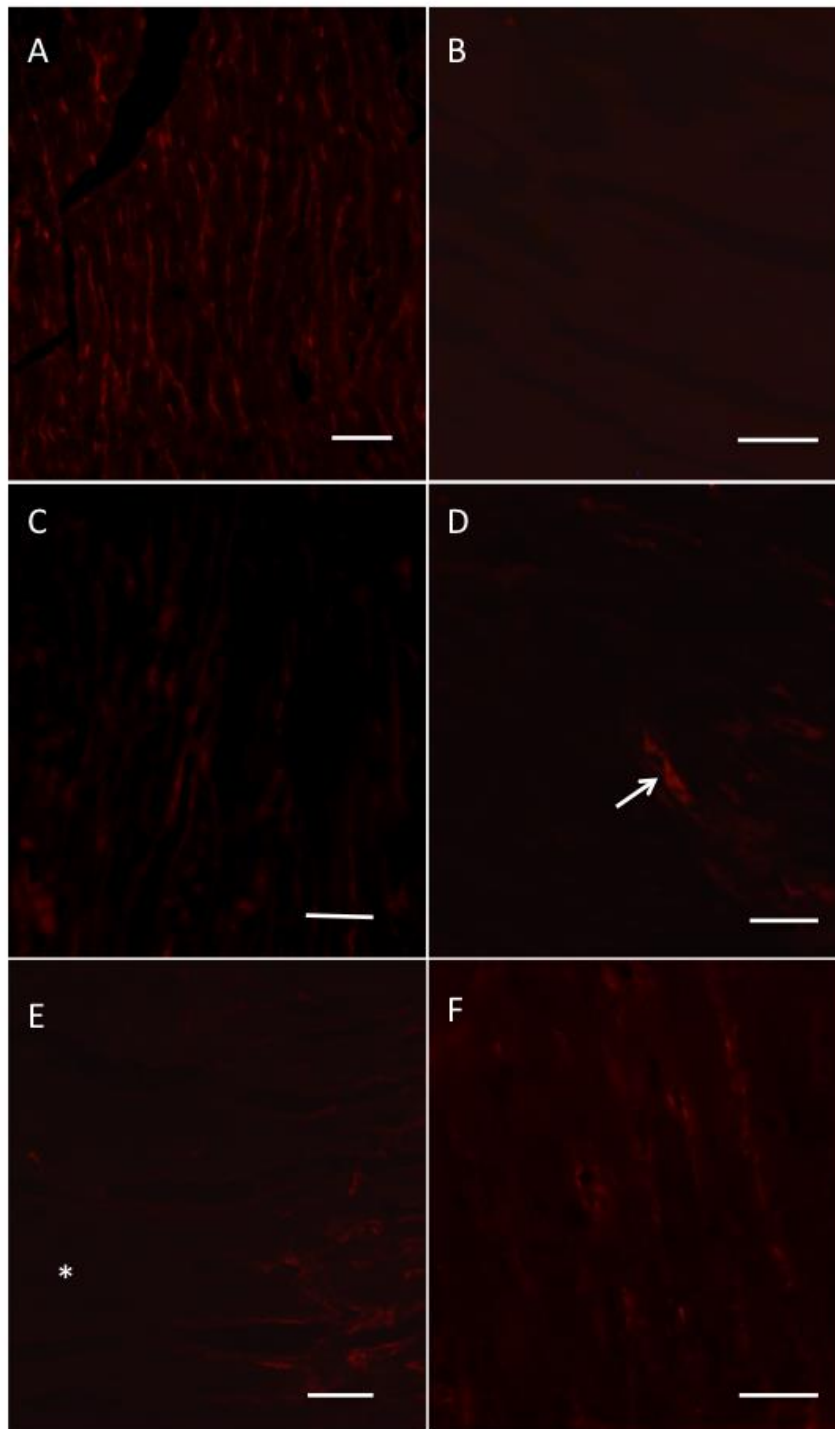


Figura 4. Eletromicrografias de ventrículo de rato controle com 88 dias de idade. A- área de miocárdio mostrando morfologia clássica de cardiomiócitos (cm), endotélio vascular (e), feixe nervoso (fn) incluindo uma varicosidade (v), conjuntivo intersticial (c) e porção de citoplasma de um fibroblasto (f). B- detalhe de um cardiomiócito mostrando miofibrilas (mf) e mitocôndrias (m) bem preservadas, além de feixe nervoso (fn) à esquerda. c= conjuntivo intersticial.

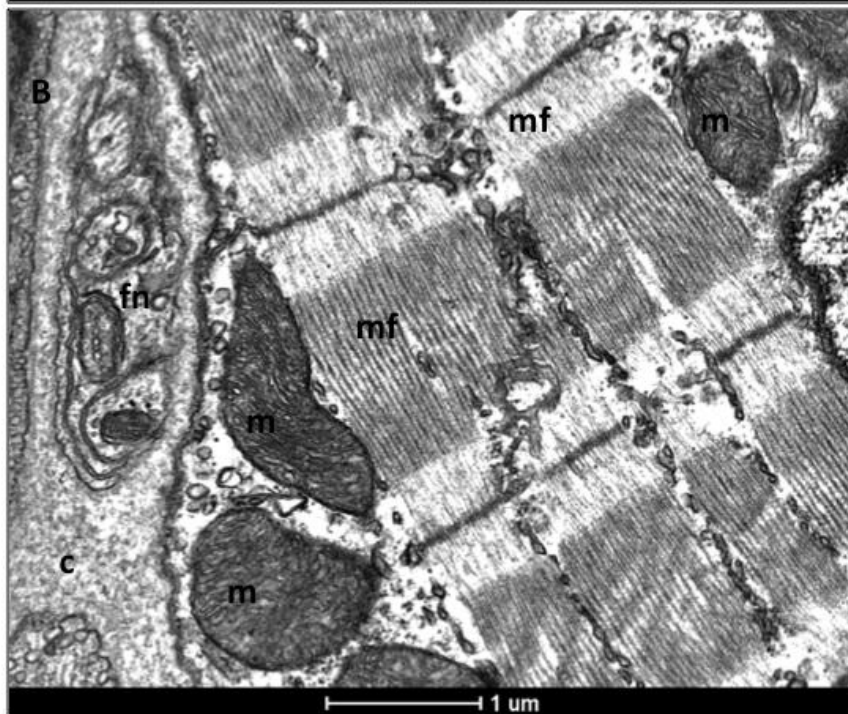
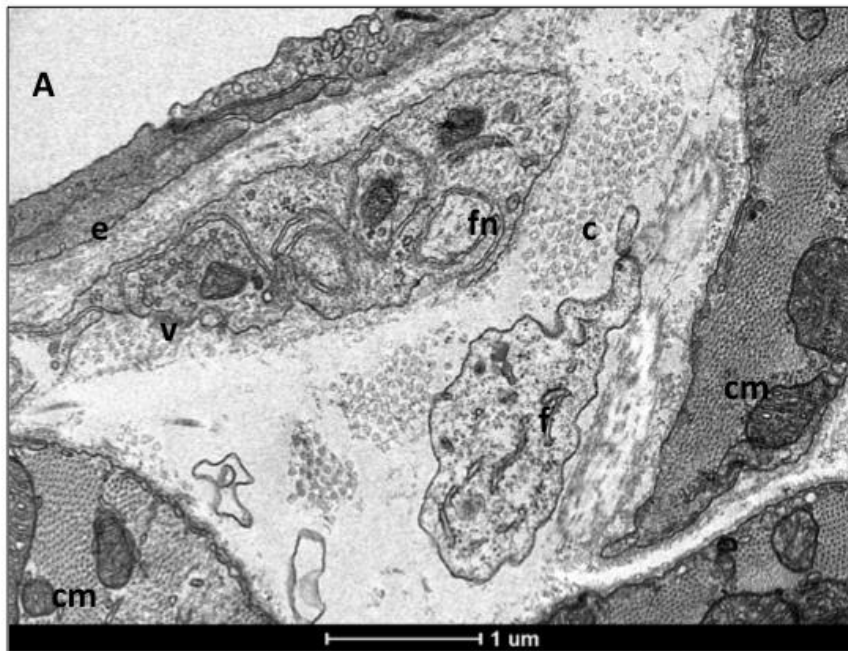


Figura 5. Eletromicrografias de ventrículo de rato controle com 58 dias de idade. A- imagem de dois axônios autonômicos percorrendo interstício do miocárdio. Setas vermelhas indicam varicosidades e setas verdes indicam regiões intervaricosas do axônio. B- detalhe da imagem anterior, mostrando dimensões de uma região intervaricosa do axônio (a) e de uma varicosidade (v).



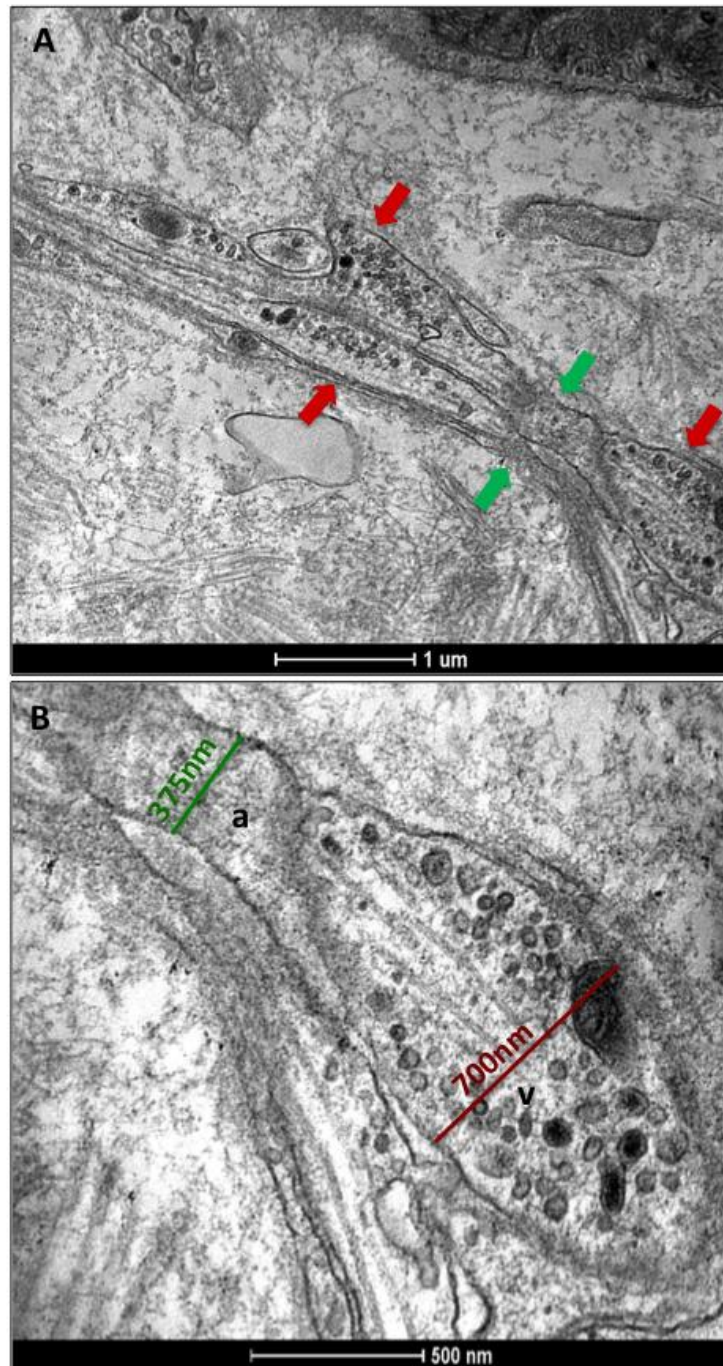


Figura 6. Eletromicrografias de ventrículo de rato controle com 88 dias de idade. A- detalhe de duas varicosidades noradrenérgicas. Círculos vermelhos delimitam vesículas pequenas granulares; círculos azuis delimitam vesículas pequenas agranulares e círculos amarelos delimitam vesículas grandes granulares. Varicosidade à direita mostra-se parcialmente envolvida por prolongamento de célula de Schwann (s) e parcialmente desnuda (seta). m= mitocôndria; cm= cardiomiócito. B- detalhe de varicosidades colinérgicas. Círculo amarelo delimita vesícula grande granular. Demais vesículas vistas na imagem são pequenas agranulares. Apenas a varicosidade central encontra-se totalmente revestida por prolongamento de célula de Schwann (s); as demais encontram-se parcialmente desnudas (setas). a= axônio.

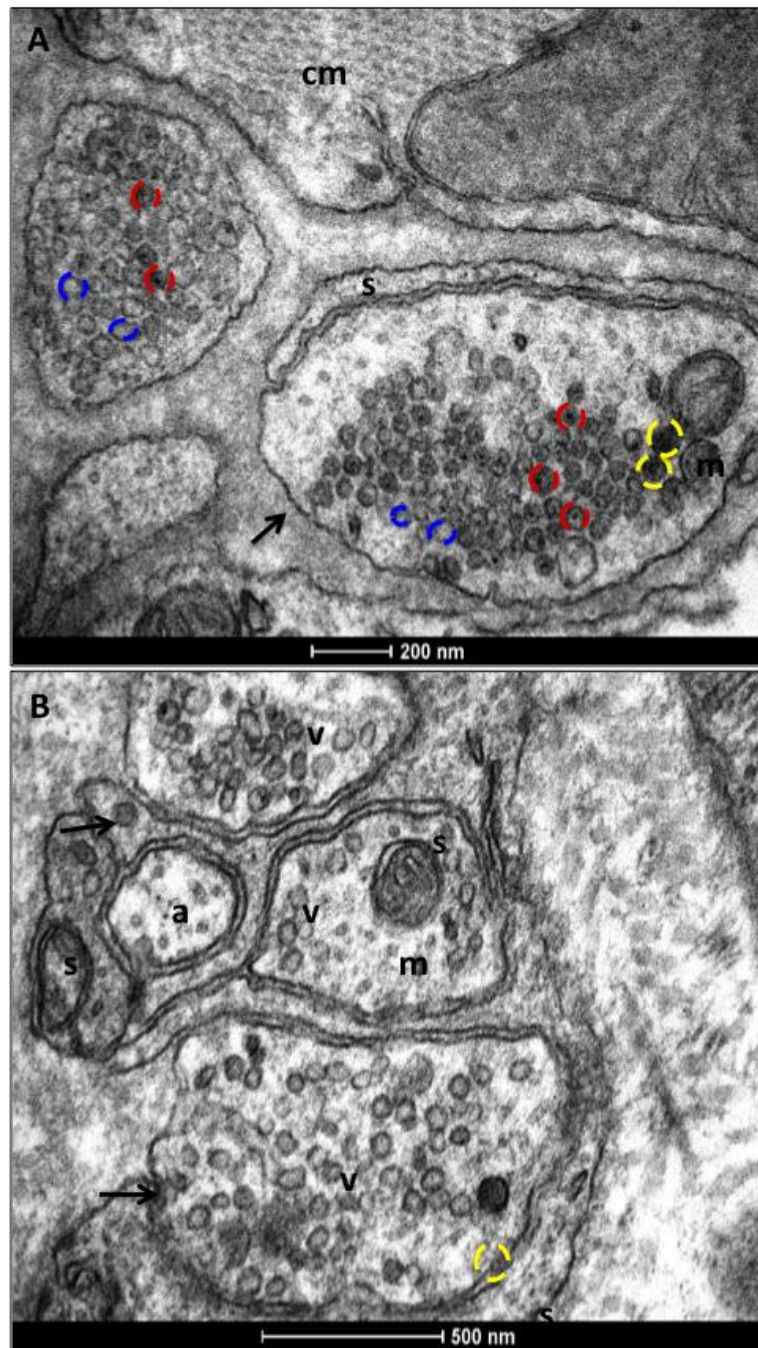


Figura 7. Eletromicrografias de ventrículo de rato com 13 dias de infecção. Músculo cardíaco mostrando área degenerada (asterisco) e vacúolos entre as miofibrilas (setas). c= conjuntivo intersticial. B- cardiomiócito (cm) infectado pelo parasito (p).

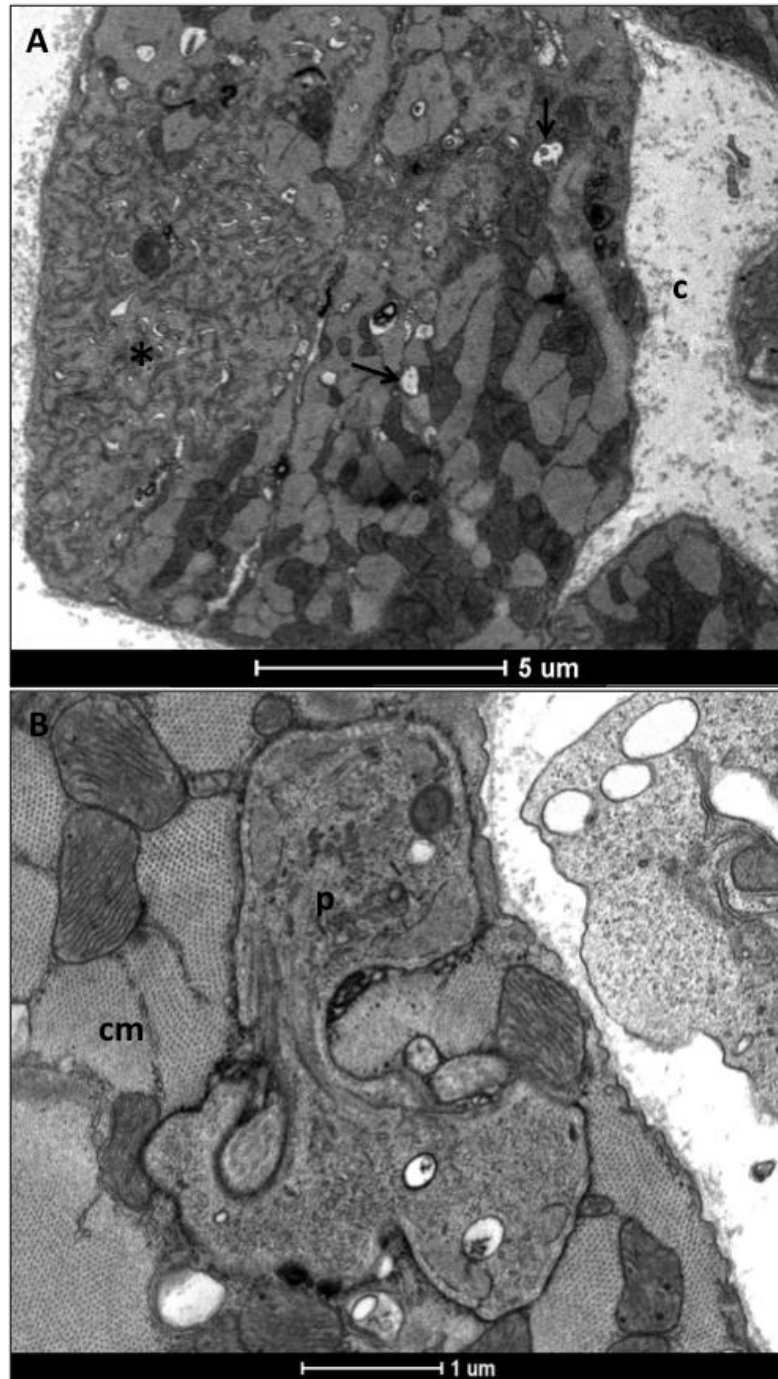


Figura 8. Eletromicrografias de ventrículo de rato com 20 dias de infecção. A- observar interstício com grande quantidade de células inflamatórias (ci). B- detalhe de macrófago (mØ) com parasito (p) em seu interior. cm= cardiomiócito.

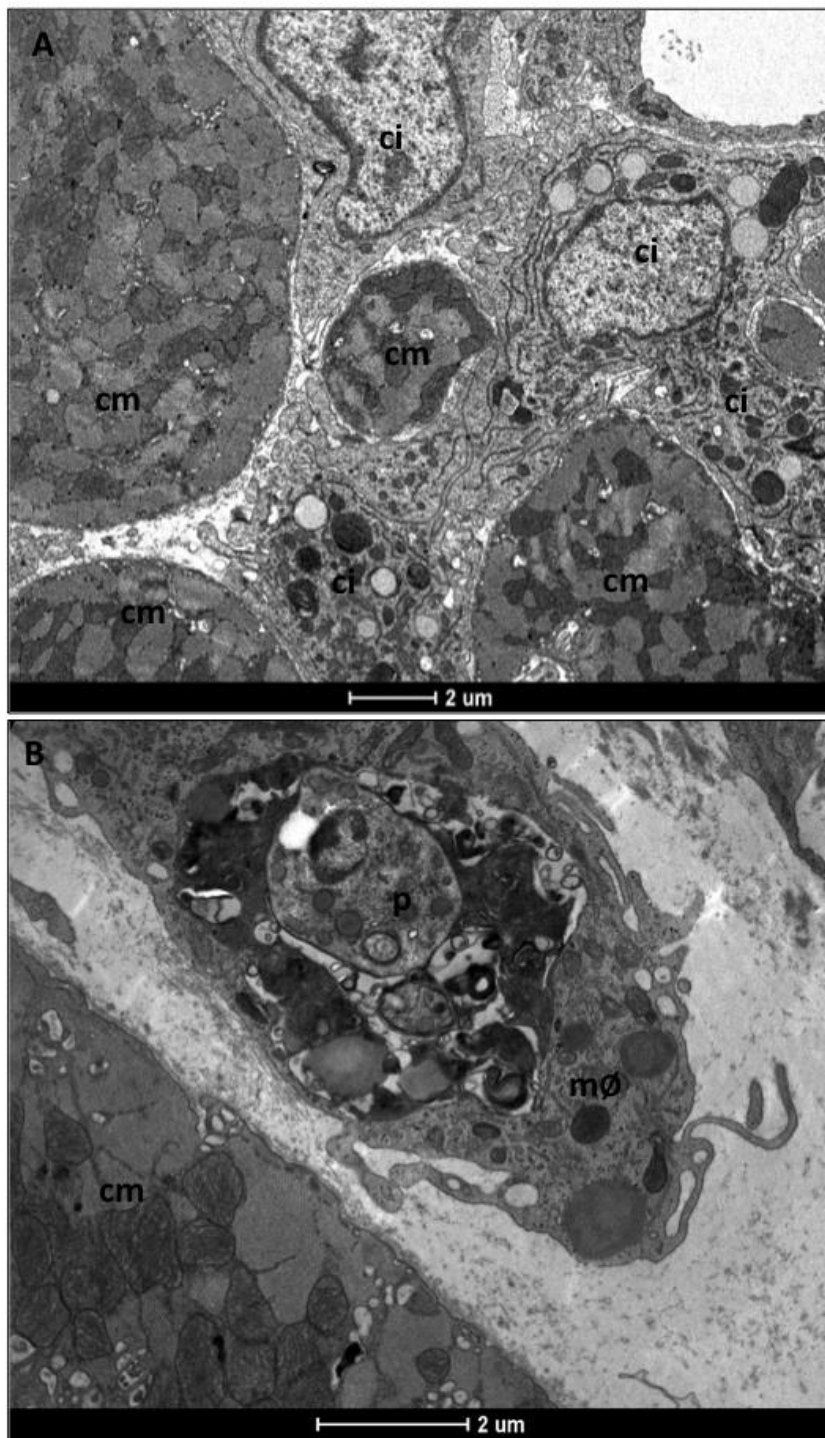


Figura 9. Eletromicrografias de ventrículo de rato com 13 (A) e 20 (B) dias de infecção. Detalhe de varicosidades degeneradas. Observar, em ambas as imagens, rarefação de vesículas de neurotransmissores, presença de vesículas pleomórficas (setas largas) e corpos densos (setas finas). cm= cardiomiócitos; m= mitocôndria; s= células de Schwann.



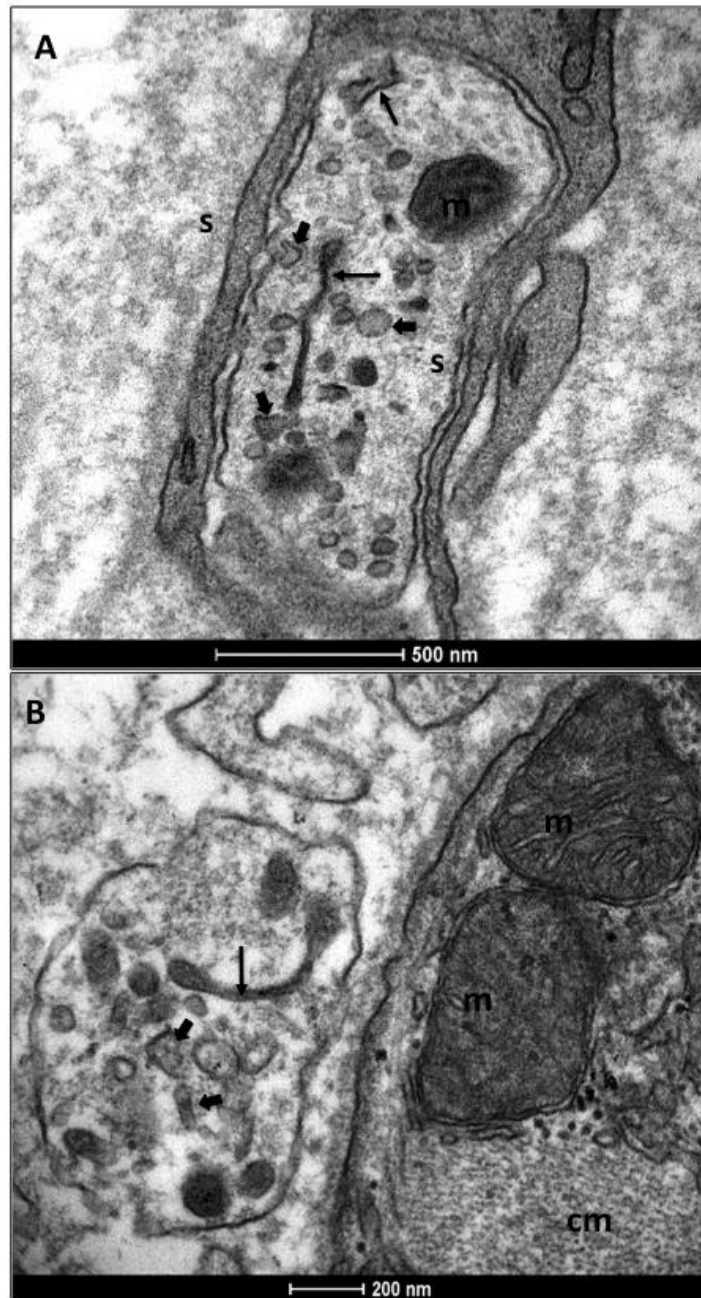


Figura 10. Eletromicrografia de ventrículo de rato com 30 dias de infecção. A- varicosidade degenerada, com pequena quantidade de vesículas de neurotransmissores, algumas com aspecto pleomórfico (setas largas). Seta fina indica área da varicosidades sem revestimento por célula de Schwann (s). B- varicosidade colinérgica com aspecto normal, totalmente envolvida por célula de Schwann (s). m= mitocôndria.

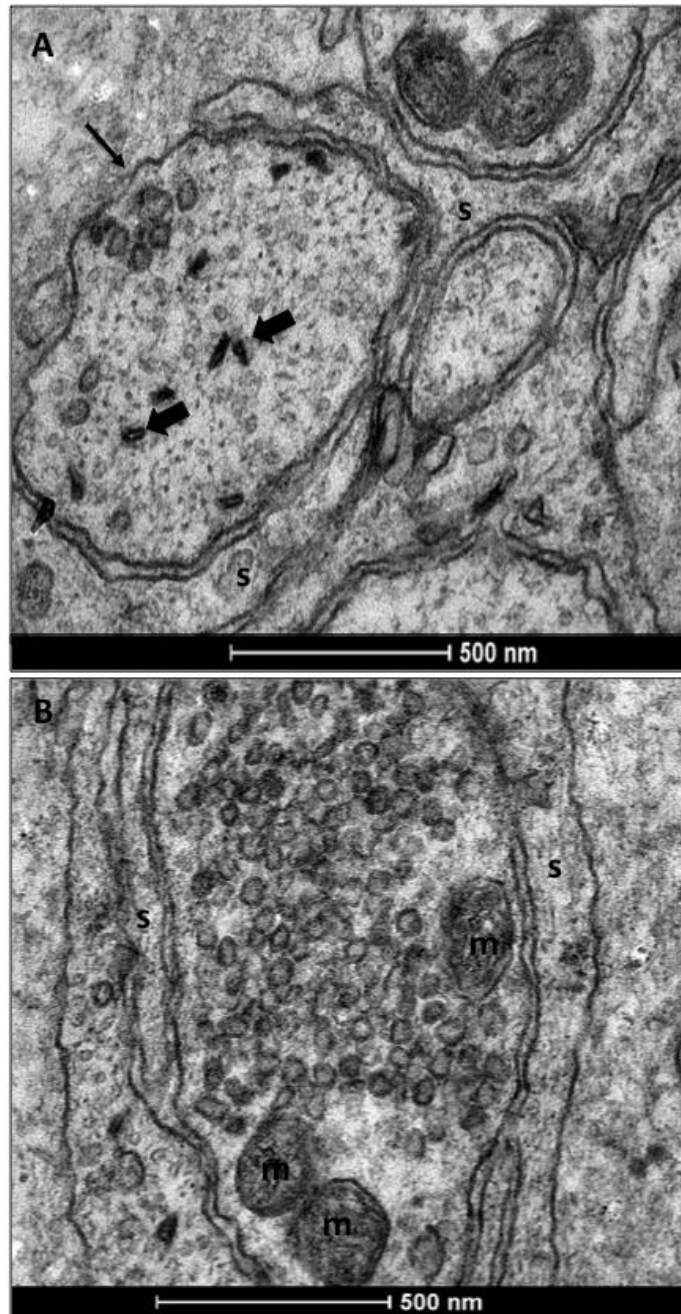


Figura 11. Eletromicrografia de ventrículo de rato com 60 dias de infecção. A- varicosidade ainda com aspecto degenerado, com pequena quantidade de vesículas de neurotransmissores, algumas com aspecto pleomórfico (seta larga) e presença de corpo denso (seta fina). B- varicosidades com aspecto normal. cm= cardiomiócitos; m= mitocôndria; s= célula de Schwann.

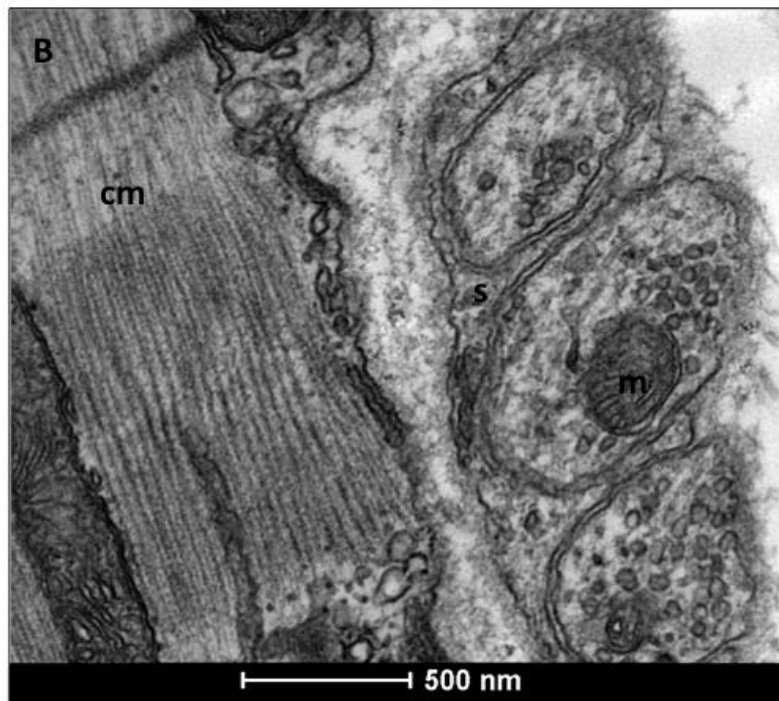
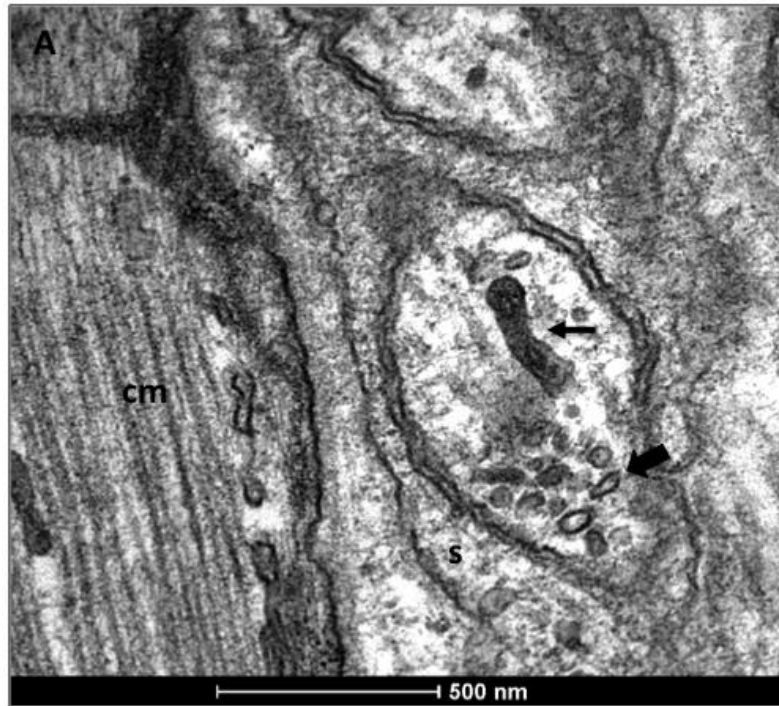


Figura 12. Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Imunofluorescência para receptor TrkA. A- animal controle com 41 dias de idade. Observar fraca fluorescência no miocárdio; B- controle da técnica por omissão do anticorpo primário; C- animal com 13 dias de infecção. Miocárdio apresenta pequeno aumento de imunofluorescência quando comparado ao de animal controle (A) e região correspondente a área de endotélio apresenta fluorescência mais evidente (setas); D- animal com 20 dias de infecção. A imunofluorescência é mais forte, quando comparada ao controle e aos demais tempos de infecção e é difusa em todo o miocárdio; E e F- animais com 30 e 60 dias de infecção, respectivamente. A imunofluorescência é semelhante à vista em animal controle (A). Barra= 50µm.

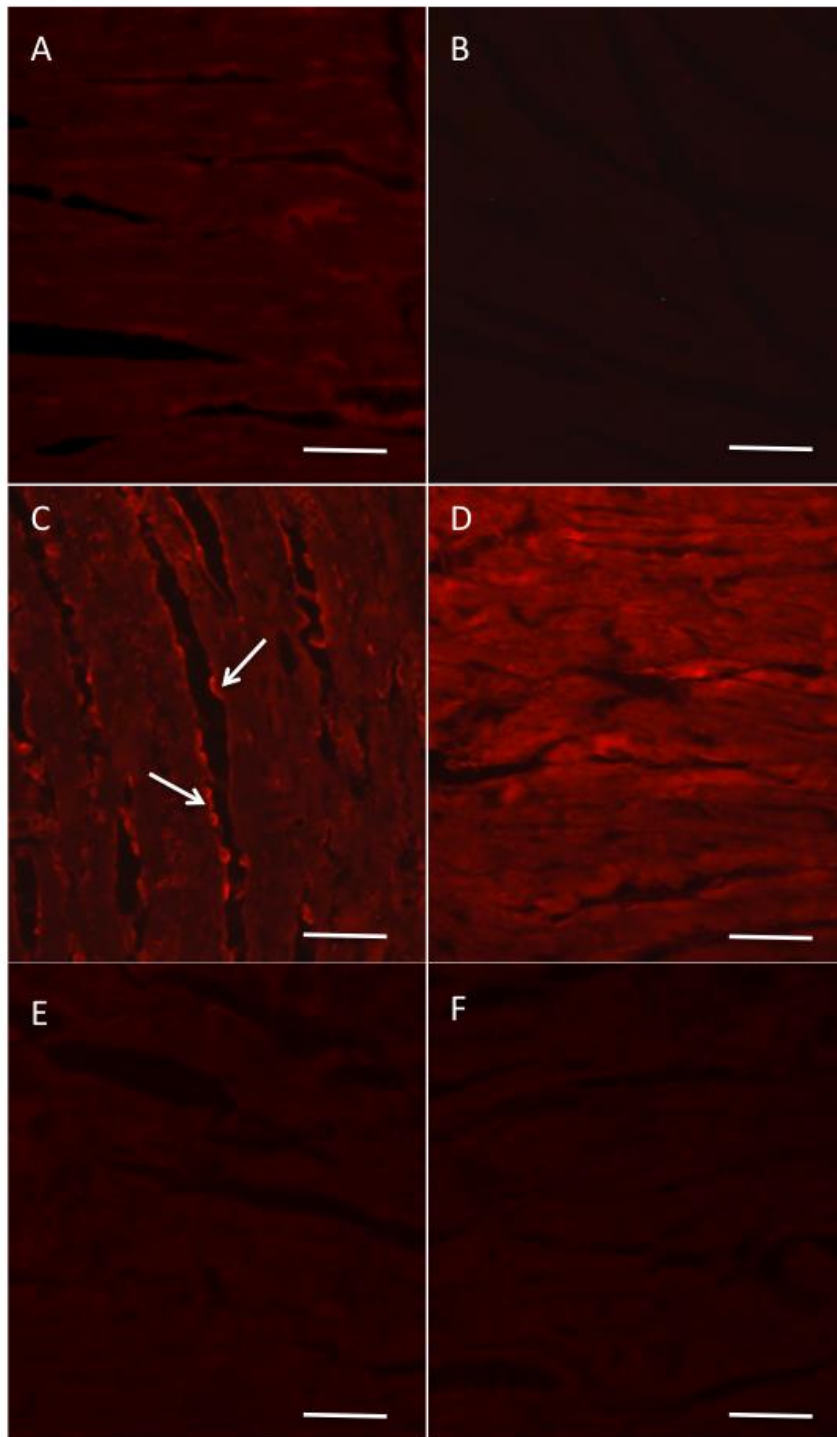


Figura 13. Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados com cepa Y de *Trypanosom cruzi*. Imunofluorescência para receptor TrkB. Nas imagens de miocárdio de animais controle (A), com 13 (C), 20 (D) e 60 dias (F) não houve imunofluorescência. Em animais com 30 dias de infecção (E) a imunomarcacão foi forte e difusa em todo o miocárdio. B- controle da técnica por omissão do anticorpo primário. Barra= 50µm.



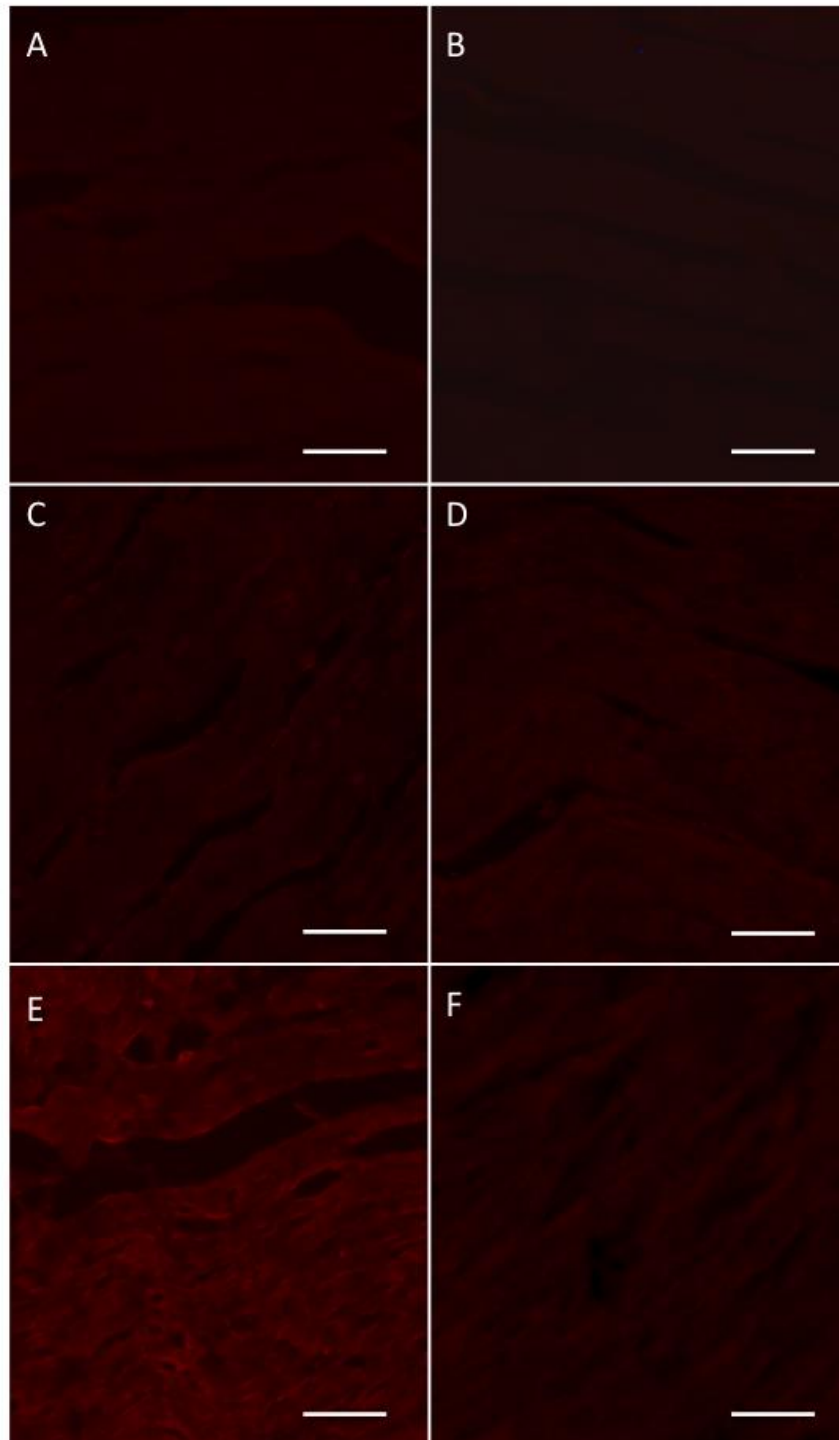
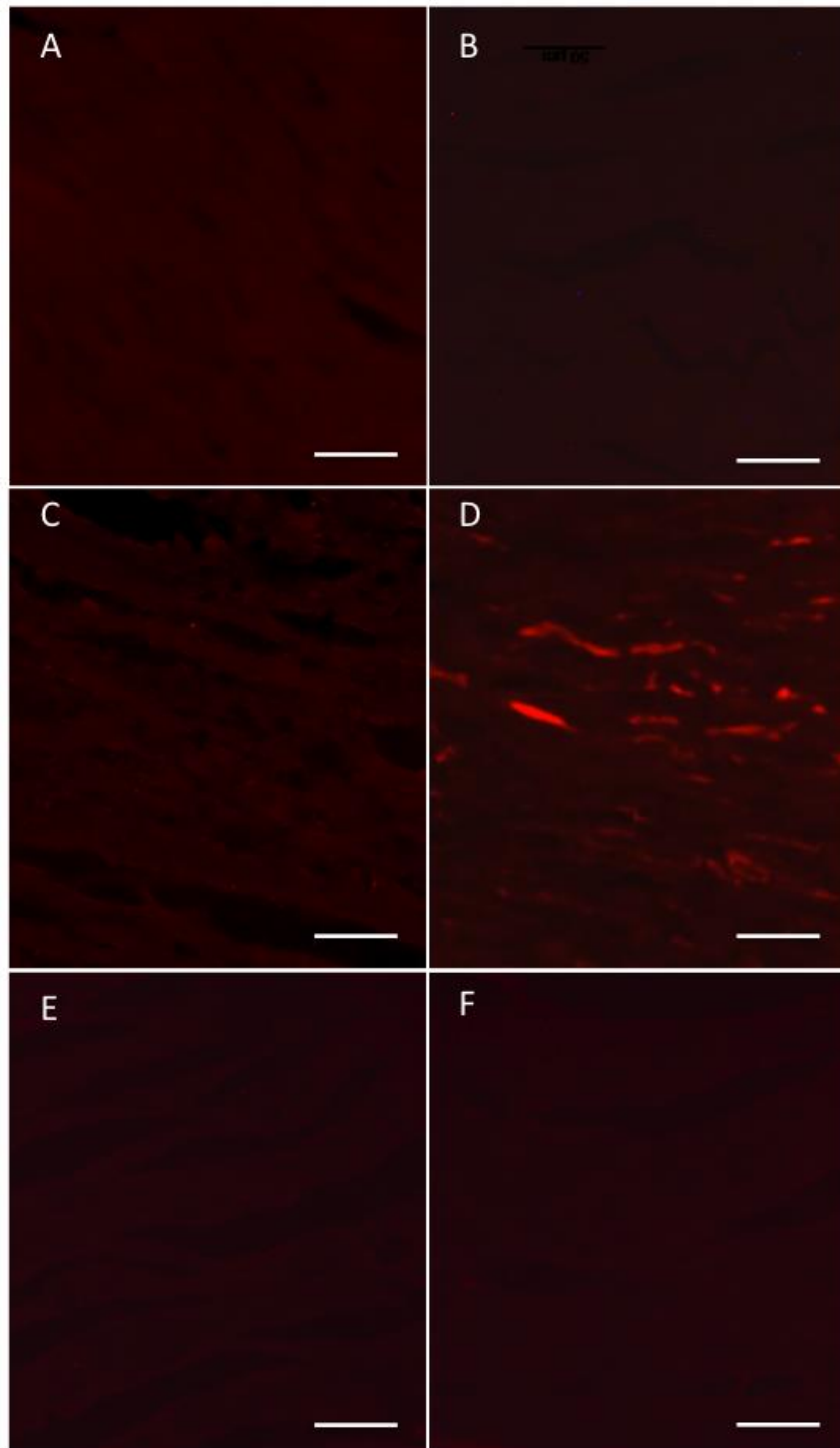


Figura 14. Fotomicrografias de ventrículo de ratos controle e infectados com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Imunofluorescência para receptor p75. Nas imagens de miocárdio de animais controle (A), com 13 (C), 30 (E) e 60 dias (F) não houve imunofluorescência. O miocárdio de animal aos 20 de infecção (D) apresenta marcante imunofluorescência na região de interstício quando comparada ao controle e aos demais tempos de infecção. A omissão do anticorpo primário aboliu toda imunofluorescência (B). Barra= 50µm.



## 6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foram demonstradas, no coração de modelo experimental da doença de Chagas, alterações ultraestruturais nas varicosidades nervosas autonômicas e mudanças na expressão das neurotrofinas NGF e BDNF e seus receptores.

Em vista da limitação dos estudos em pacientes, diferentes modelos experimentais são utilizados para elucidação dos fatores envolvidos com a complexa evolução da doença de Chagas. A maioria deles trata de modelos de cardiopatia chagásica em diferentes mamíferos, incluindo camundongos, ratos, coelhos e cães (Tafuri *et al.*, 1988; da Silva *et al.*, 1996; Jelicks & Tanowitz, 2011; Martins *et al.*, 2013; Novaes *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2016). Primatas não humanos também são usados e considerados desenvolver, principalmente, a forma crônica indeterminada da doença (Bonecini-Almeida *et al.* 1990; de Almeida *et al.* 1992; Jelicks & Tanowitz, 2011). O modelo experimental da doença de Chagas utilizado neste projeto - ratos jovens infectados com cepa Y de *T. cruzi* - foi extensivamente estudado e caracterizado pelo grupo do laboratório Profa Conceição Machado (ICB/UFMG). Em relação às alterações cardíacas na infecção com a cepa Y, esse grupo mostrou, por estudos histológicos, ultraestruturais, histoquímicos e bioquímicos que, na fase aguda da infecção, além de níveis parasitêmicos elevados, o coração dos animais apresenta elevado parasitismo, além de uma miocardite associada à desnervação autonômica (Machado *et al.*, 1978, 1979, 1987; Mello & Machado, 1998; Machado & Ribeiro, 1989; Guerra *et al.*, 2001). Após a fase aguda, que dura em torno de trinta dias, observa-se grande redução da parasitemia e do parasitismo, com resolução da inflamação e recuperação da densidade de inervação autonômica e dos níveis de neurotransmissores no coração (Machado *et al.*, 1978, 1979, 1987; Martinelli *et al.*, 2006). Este modelo pode ser considerado bom modelo da fase indeterminada da doença de Chagas, uma vez que, na fase crônica da infecção, os animais não apresentam sinais da doença e nem alterações histopatológicas importantes, não somente no coração, mas também em outros órgãos, como músculo esquelético e órgãos do sistema digestório (Alves & Machado, 1984; Machado *et al.*, 1984; Camargos *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2004). Considerando que o conhecimento dos fatores associados ao estabelecimento da fase indeterminada pode contribuir significativamente para o entendimento da evolução clínica de pacientes chagásicos (Rocha *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2011), torna-se importante o estudo dos fenômenos de degeneração e regeneração da inervação autonômica cardíaca nesse modelo, assim como os fatores envolvidos nesse processo.

Com o objetivo de avaliar os períodos de desnervação e reinervação ao longo da infecção no modelo usado e, então, orientar o estudo da expressão de neurotrofinas e seus receptores, realizamos a imunomarcção de fibras nervosas cardíacas ventriculares em 4 momentos após a infecção: 13 e 20 dias, correspondentes à fase aguda, e 30 e 60 dias, correspondentes à fase tardia, períodos considerados chave no estudo proposto, levando-se em conta parâmetros já estudados pelo grupo. Assim, é sabido que aos treze dias após infecção, nesse modelo, a desnervação autonômica cardíaca é moderada à severa. Já aos vinte dias após a infecção, a desnervação autonômica simpática é total e a parassimpática mantém-se acentuada (MACHADO et al., 1979; MACHADO & RIBEIRO, 1989; CAMARGOS et al., 2000). Animais com 30 dias de infecção podem ser considerados como estando no início do processo de recuperação do miocárdio, com resolução do processo inflamatório e queda da parasitemia, mas ainda com desnervação total (MACHADO & RIBEIRO, 1989; CAMARGOS et al., 2000). Aos 60 dias, os animais apresentam recuperação parcial da inervação autonômica (MACHADO et al., 1979; MARTINELLI *et al.*, 2006). Ainda, de grande importância, Martinelli e colaboradores (2006) verificaram aumento significativo dos níveis de NGF cardíacos aos 20 dias de infecção, os quais retornaram aos níveis observados nos animais controles aos 60 dias de infecção.

Nossos experimentos nesse trabalho confirmaram o processo de desnervação e reinervação cardíaca nesse modelo. Importante, o processo de desnervação demonstrada em estudos anteriores, foi determinado por métodos indiretos, de marcação histoquímica de neurotransmissores no interior das fibras nervosas. A imunomarcção de neurofilamento M, utilizada neste estudo, revela, de forma direta, a densidade de fibras nervosas no miocárdio, sejam elas aferentes ou eferentes, uma vez que a referida proteína é componente estrutural do citoesqueleto de neurônios (PARLAKIAN *et al.*, 2016). Anticorpos contra neurofilamentos são amplamente utilizados para identificar neurônios e seus processos em secções histológicas (PETZOLD, 2005).

Assim, confirmamos que, tanto aos 13 quanto aos 20 dias de infecção, a desnervação cardíaca foi severa, com marcada redução da fluorescência das fibras nervosas. Já aos trinta dias de infecção, a desnervação ainda era importante, mas em poucas áreas do miocárdio foi possível visualizar algumas fibras nervosas fluorescentes. A observação dessas poucas fibras difere dos estudos anteriormente citados e é indicativo de um início de processo regenerativo das fibras nervosas nesse período após infecção. Essa diferença pode ser atribuída ao método utilizado para análise da densidade de nervos,

uma vez que a marcação para neurofilamento permite a visualização de todos os tipos de fibras nervosas no tecido, incluindo, além das autonômicas, fibras sensoriais. Ainda, a diferença pode ser atribuída também à amostragem do tecido ventricular utilizado para análise, uma vez que a área de reinervação vista aos 30 dias nesse estudo era bastante reduzida em comparação com as áreas totalmente desnervadas, de grande extensão. Aos 60 dias após a infecção, como descrito anteriormente, já era possível a observação de áreas maiores reinervadas, porém ainda não havia recuperação total da inervação.

A análise ultraestrutural do miocárdio mostrou a presença de processo infeccioso importante, tanto aos 13 quanto aos 20 dias. Foram observados parasitos intracelulares, tanto em cardiomiócitos quanto em macrófagos, além de numerosas células inflamatórias no interstício. Parasitismo e inflamação durante a fase aguda da infecção foram bem documentados por Machado e Ribeiro (1989).

No que se refere às terminações nervosas autonômicas, foram observados os dois tipos característicos de terminações ou varicosidades, adrenérgicas e noradrenérgicas. A distinção ultraestrutural entre essas terminações é normalmente feita com base nos tipos de vesículas de neurotransmissores. Varicosidades colinérgicas são caracterizadas por apresentarem, predominantemente, vesículas pequenas (40-60nm de diâmetro) e claras, ou eletrólúcidas, que se referem às vesículas contendo principalmente acetilcolina. Ainda, grandes vesículas granulares (80-200nm de diâmetro), contendo núcleo eletrondenso, também são vistas, porém em número bem menor do que o das vesículas claras. Esse tipo de vesícula pode conter, além da própria acetilcolina, diferentes peptídeos, sendo o mais comumente descrito o Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP). A grande concentração desses peptídeos reflete na formação do núcleo denso no interior da vesícula.

Já as varicosidades noradrenérgicas caracterizaram-se por apresentarem grande número de vesículas pequenas granulares, além de vesículas pequenas claras e, ainda, algumas vesículas grandes granulares. Todos os três tipos de vesículas são considerados conter noradrenalina, além de peptídeos como o neuropeptídeo Y (NPY) e neurotensina, entre outros (CHIBA & YAMAUCHI, 1970; SMOLEN, 1978; PRINCE, 1996; WIDIAPRADJA *et al.*, 2017). Entretanto, diferentes estudos mostram a existência de heterogeneidade do conteúdo das vesículas noradrenérgicas. Essa heterogeneidade é justificada pela presença de diferentes peptídeos associados à noradrenalina e, também, pelo fato das vesículas conterem diferentes concentrações de noradrenalina, principal responsável pela formação de núcleos densos em seu interior. Essas diferenças

determinam variação na morfologia das vesículas noradrenérgicas e considera-se que não há correlação bem estabelecida entre conteúdo e ultraestrutura vesicular. Vesículas granulares podem apresentar núcleo denso com dimensões bastante variáveis, de forma que podem ser visualizados preenchendo quase toda a vesícula ou como uma região central bastante reduzida, a qual pode mesmo, não ser visualizada dependendo do nível do corte ultrafino. Essas vesículas seriam, na verdade, as denominadas pequenas agranulares, que não constituem um tipo diferente de vesícula, mas sim a vesícula granular cujo corte não passou pelo núcleo eletrondenso (FILLENZ & POLLARD, 1976; FILLENZ & STANFORD, 1981; GIBBINS, 1982; BURNSTOCK, 1986). Em nosso estudo, essas variações na estrutura das vesículas, principalmente as noradrenérgicas, associadas à grande rarefação de vesículas decorrente do processo degenerativo das mesmas, tornou difícil, ou mesmo impossível, a distinção entre varicosidades noradrenérgicas e colinérgicas nos animais infectados. Assim, como definido em nossa metodologia, para análise dessas terminações nas diferentes fases da infecção, foram consideradas, todas elas, como varicosidades autonômicas, sem distinção entre noradrenérgicas e colinérgicas.

Aos 13 e 20 dias de infecção, as terminações nervosas autonômicas tornaram-se extremamente rarefeitas no miocárdio ventricular, confirmando os dados obtidos pela imunofluorescência de fibras nervosas. Além disso, as raras terminações observadas apresentavam vários sinais de degeneração, com destaque para as vesículas de neurotransmissores, que se mostraram significativamente reduzidas em densidade e com morfologia alterada; e para as mitocôndrias, que apresentavam cristas pleomórficas e eletrondensidade alterada. A redução drástica no número de vesículas de neurotransmissores é refletida na queda importante dos níveis de noradrenalina e acetilcolina, observadas no coração desses animais por Machado e colaboradores (1975; 1979). Melo & Machado (1998), em uma análise ultraestrutural qualitativa do miocárdio desse mesmo modelo experimental, também observaram a presença de varicosidades degeneradas aos 12 dias de infecção, as quais, segundos os autores, apresentavam sinais de edema, corpos densos, axolema irregular e agrupamento de vesículas sinápticas e de elementos do citoesqueleto.

Em outro modelo da doença, ou seja, camundongos inoculados com a cepa 21SF de *T. cruzi*, Ribeiro e colaboradores (2002) também observaram alterações degenerativas nas terminações nervosas autonômicas atriais, como alterações mitocondriais, presença de corpos densos e de edema intersticial. Entretanto os autores não observaram rarefação

de vesículas de neurotransmissores. Tal fato pode ser explicado tanto por diferenças na resposta à infecção dos diferentes hospedeiros quanto pela população e inóculo de *T. cruzi* utilizados, sabendo que esses são fatores importantes na histopatogênese da infecção (ANDRADE, 1999; CAMARGOS et al., 2002; TALVANI & TEIXEIRA, 2011).

A análise ultraestrutural do miocárdio de animais aos 30 e 60 dias de infecção mostrou que, nesse período, já era possível a observação de terminações autonômicas com ultraestrutura normal, semelhante àquelas vistas nos animais controles, ao lado de terminações degeneradas. Essa observação corrobora os dados obtidos pela imunofluorescência de fibras nervosas e reafirma a existência de processo regenerativo das terminações nervosas nesse período. Tal fato mostra-se interessante, visto que o trigésimo dia de infecção, nesse modelo, caracteriza-se pelo início de resolução da fase aguda, onde, como já dito anteriormente, ocorre redução da parasitemia, do parasitismo e de processos inflamatórios (MACHADO & RIBEIRO, 1989). Assim, esse período parece determinado por uma resposta regenerativa importante, que deve culminar com a recuperação do animal, determinando evolução para uma condição correspondente à fase indeterminada da doença.

Os processos envolvidos na degeneração de fibras nervosas cardíacas, apesar de ainda não totalmente esclarecidos, são bastante estudados e incluem a ação direta do parasito e o processo inflamatório (MELO & MACHADO, 1998; ANDRADE, 1999; GUERRA et al., 2001; MARIN-NETO et al., 2007; BONNEY & ENGMAN, 2015).

Quanto aos fatores responsáveis pela recuperação das fibras nervosas, estes são bem menos estudados e quase nada se sabe sobre eles. No presente estudo, verificamos aumento dos níveis de NGF no coração de animais infectados. O aumento foi observado somente aos 20 dias de infecção, sendo que nos demais períodos os níveis do fator permaneceram semelhantes aos observados no coração de animais controles. Martinelli e colaboradores (2006), estudando esse mesmo modelo de doença de Chagas, também verificaram aumento de NGF no coração, aos 20 dias de infecção, e sugeriram um papel para o fator no processo regenerativo das fibras nervosas simpáticas cardíacas.

Em nosso estudo, verificamos que, além de um aumento nos níveis cardíacos de NGF, seu receptor de alta afinidade, TrkA, também se mostrou com expressão aumentada no miocárdio dos animais, aos 13 e aos 20 dias de infecção, mais acentuada aos 20 dias. Aos 13 dias, a imunomarcagem foi mais evidenciada em regiões correspondentes ao endotélio vascular, tendo sido observada uma menor expressão do receptor por



cardiomiócitos nesse período. Já aos 20 dias, a imunofluorescência se estendeu a todo o miocárdio, incluindo cardiomiócitos e demais elementos do interstício. É bem estabelecido que, no coração, diferentes tipos celulares constituem alvo para ação do NGF, durante o desenvolvimento e na vida adulta (EMANUELI *et al.*, 2014). Diferentes estudos mostram que NGF e seu receptor TrkA são expressos por cardiomiócitos (MARTINELLI *et al.*, 2006; MELONI *et al.*, 2010), células endoteliais (MELONI *et al.*, 2010), neurônios (SOFRONIEW *et al.*, 2001; MOK & CAMPENOT, 2007; SAYGILI *et al.*, 2010) e células inflamatórias, entre outras. Quanto às células inflamatórias, destacam-se macrófagos (HASAN *et al.*, 2006), mastócitos (KRITAS *et al.*, 2014) e linfócitos (LAMBIASE *et al.*, 1997; BONINI *et al.*, 1999), que secretam NGF e são alvos para o mesmo.

Em nosso estudo, a observação de uma maior expressão de TrkA pelo endotélio, em fase anterior à uma maior expressão por cardiomiócitos e outros elementos do interstício, sugere uma cinética de atuação do NGF em diferentes componentes cardíacos, ao longo da infecção. Assim, o aumento de NGF e TrkA observado em um primeiro momento da fase aguda da infecção, poderia relacionar-se principalmente com estímulo de processos angiogênicos, importantes para a recuperação do miocárdio vista em períodos subsequentes. Por outro lado, um aumento da responsividade ao NGF, vista aos 20 dias de infecção, poderia estar relacionada à uma resposta do miocárdio à desnervação intensa nesse período. NGF liberado por cardiomiócitos ou outros tipos celulares ali presentes, via ligação ao TrkA em terminações nervosas e consequente transporte retrógrado a corpos neuronais ganglionares, favoreceria o processo de recuperação das fibras nervosas, observado a partir do trigésimo dia de infecção. A atuação sobre processos de reinervação parece estar associada principalmente à recuperação de fibras noradrenérgicas, uma vez que essas parecem ser o principal alvo do NGF (HASAN *et al.* 2013). Ainda, NGF poderia, também, atuar sobre os próprios cardiomiócitos, favorecendo sua sobrevivência e, então, contribuir para a recuperação do miocárdio como um todo na fase crônica da infecção. Vários estudos corroboram nossos achados e apontam o NGF como fator importante em processos degenerativos e regenerativos que ocorrem no coração. Foi demonstrado que em ratos, após isquemia do miocárdio, macrófagos e miofibroblastos aumentaram a síntese de NGF, o qual foi relacionado ao processo de hiperinervação simpática que ocorreu na área infartada (HILTUNEN *et al.*, 2001; HASAN *et al.*, 2006). Em coração humano infartado, Meloni e colaboradores (2010) observaram que cardiomiócitos próximos à área isquêmica

aumentaram a expressão de NGF, enquanto a expressão de TrkA foi vista aumentada tanto em cardiomiócitos quanto em células endoteliais. Ainda, os autores mostraram que, em camundongos, a supressão de NGF aboliu o processo angiogênico reparativo, aumentou a apoptose de cardiomiócitos e piorou a função cardíaca após infarto do miocárdio. Por outro lado, a indução da expressão de NGF melhorou a sobrevivência das fibras cardíacas, promoveu neovascularização e melhorou o fluxo sanguíneo e função cardíaca nos animais. A ação pró-sobrevivência de cardiomiócitos de NGF, via seu receptor TrkA, foi também demonstrada *in vitro* por Caporali e colaboradores (2008). Notavelmente, um estudo de Hasan e colaboradores (2006) demonstrou que NGF liberado por células inflamatórias possui papel essencial na reinervação simpática do miocárdio após isquemia. Além disso, NGF aumenta atividade de células inflamatórias, inclusive a produção de citocinas e fatores de crescimento por elas (BAROUCH *et al.*, 2001; BONINI *et al.*, 2003). Em nosso estudo, não podemos descartar a participação de células inflamatórias nos processos degenerativos e/ou regenerativos observados, uma vez que são componentes importantes do processo histopatológico que se instala no coração ao longo da fase aguda da INFECÇÃO (MACHADO & RIBEIRO, 1989; MELLO & MACHADO, 1998; GUERRA *et al.*, 2001). Assim, considera-se que as ações do NGF no miocárdio, durante a infecção por *T. cruzi*, poderiam ser diretas, por atuarem em nervos, cardiomiócitos e células endoteliais, ou indiretas, por estimular a produção de fatores de crescimento e outras moléculas por células inflamatórias.

Interessante, em nosso estudo, um aumento de NGF sérico foi observado aos 13 dias de infecção, sugerindo fonte exógena de NGF para o coração. Entre diferentes órgãos com capacidade de síntese e liberação de NGF destacam-se as glândulas salivares submandibulares, fontes reconhecidas do fator, podendo inclusive liberá-lo para a circulação (ALOE *et al.*, 1986, ALLEVA *et al.*, 1996). Um estudo em nosso laboratório mostrou que a glândula submandibular de ratos infectados com *T. cruzi* apresenta aumento na síntese de NGF, durante a fase aguda da infecção (dados não publicados). Assim, a ativação de processos regenerativos no miocárdio poderia envolver ação do NGF, vias seu receptor TrkA, produzido pelo próprio coração, mas também proveniente da circulação.

Em nosso trabalho, foram avaliados também os níveis séricos e teciduais de BDNF, além da expressão de seu receptor de alta afinidade, TrkB, no miocárdio. Os níveis cardíacos de BDNF mostraram-se, de maneira geral, maiores que os de NGF, porém não

foi observada alteração em animais infectados, em nenhum dos tempos de infecção avaliados, quando comparados aos seus controles. A presença de BDNF em níveis consideráveis nos animais controles pode ser justificada, entre outras, pela sua importância nas funções normais de contração e relaxamento do miocárdio (FULGENZI *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2014). Sabe-se que tanto cardiomiócitos quanto células endoteliais expressam BDNF e TrkB (DONOVAN *et al.*, 2000; HILTUNEN *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2014). No que se refere à infecção chagásica, apesar dos níveis de BDNF não terem se mostrados mais elevados nos animais infectados, a expressão de TrkB foi maior no miocárdio aos 30 dias de infecção, o que poderia indicar uma maior responsividade do tecido cardíaco ao fator, que então teria ação nos processos regenerativos que ocorrem a partir desse período de infecção. Corroborando essa assumption, em modelo experimental de isquemia seguida de reperfusão, foi sugerida a participação de BDNF na patogênese da lesão cardíaca e, mesmo, nas alterações da função neuronal simpática que ocorrem nessa condição (HILTUNEN *et al.*, 2001). Um trabalho recente de Lin e colaboradores (2016) indicou que as ações do BDNF na recuperação de nervos periféricos seriam principalmente via estimulação de células de Schwann, as quais, uma vez ativadas, secretariam fatores promotores da regeneração nervosa. BDNF também poderia apresentar papel importante no processo angiogênico durante a recuperação do miocárdio nesse período, visto que o mesmo estimula a sobrevivência e estabilização do endotélio de capilares e arteríolas coronárias, via seu receptor TrkB (DONOVAN *et al.*, 2000). Sabe-se que a interação entre TrkB e BDNF é responsável por uma sinalização anti-apoptótica (REICHARDT, 2006). Curiosamente, os níveis séricos de BDNF mostraram-se menores em animais com 13 e 20 dias de infecção, quando comparados aos de seus respectivos controles. Mani *et al.* (2005) também observaram redução de BDNF no plasma de pacientes com síndrome coronariana aguda e sugeriram que a deficiência do fator nessa situação poderia contribuir para o desenvolvimento da patologia. Por outro lado, Lorgis e colaboradores (2008) verificaram que em pacientes com angina estável, os níveis séricos de BDNF estavam aumentados, relacionados com a ativação de plaquetas e resposta inflamatória. É bem determinado que plaquetas produzem e armazenam quantidades significativas de BDNF, sendo consideradas principal fonte do fator no sangue (SERRA-MILLÀS, 2016). Um dos aspectos histopatológicos da infecção chagásica é o tromboembolismo, visto ocorrer nos vasos cardíacos, mas também em outros órgãos, como pulmões, rins, baço e cérebro (ROSSI *et al.*, 1984; TANOWITZ *et al.* 1996; PRATA, 2001). Uma vez

que plaquetas estão diretamente envolvidas na formação de trombos, esse processo poderia, de alguma forma, alterar a disponibilização de BDNF para a circulação, o que levaria à redução de seus níveis circulantes. Entretanto, a comprovação desse mecanismo envolve estudos adicionais, para verificar, nesse modelo, a formação de trombos e o envolvimento de plaquetas, incluindo a contribuição das mesmas para os níveis de BDNF durante a infecção chagásica.

Importante, sabe-se que tanto TrkA quanto TrkB podem se ligar, com menor afinidade, a outras neurotrofinas. NT3 pode se ligar tanto à TrkA quanto à TRkB, enquanto NT-4/5 pode se ligar à TrkB (SQUINTO et al., 1991; KLEIN *ET AL.*, 1991B; IP *et al.*, 1992). Alguns estudos demonstram o potencial do coração em expressar NT-3 e NT-4/5 (SCARISBRICK et al 1993; TIMMUSK *et al.*, 1993; ZHANG & RUSH, 2001). De acordo com Zhou e colaboradores, NT3 é expressa no coração e está implicada na diferenciação e manutenção de neurônios simpáticos. Foi sugerido que uma diminuição nos níveis cardíacos de NT-3 possa alterar as funções simpáticas no órgão (KREUSSER, *et al.*, 2008). Além disso, neurônios simpáticos localizados em gânglios são fontes de NT3 para tecidos periféricos, incluindo o coração e sabe-se que o fator é importante, via ação autócrina, para a sobrevivência desses neurônios (FRANCIS *et al.*, 1999). Dessa forma, não se pode descartar a participação de NT-3 e/ou NT-4/5 nos processos degenerativos ou regenerativos que ocorrem durante a infecção chagásica. A verificação dos níveis dessa neurotrofinas, no coração e, mesmo, no sangue e outros órgãos de animais infectados, certamente contribuiria para elucidação do papel de fatores neurotróficos nas condições estudadas.

Por fim, em nosso estudo demonstramos que o receptor p75 aumentou sua expressão no miocárdio, aos 20 dias de infecção. A marcação mostrou-se mais restrita que aquela vista para os receptores TrkA e TrkB e foi coincidente com área do interstício ventricular. Sabe-se que todas as neurotrofinas se ligam ao p75, com igual afinidade, porém menor que aquela de ligação aos receptores Trk. Por outro lado, sabe-se que p75 apresenta maior afinidade por pró-neurotrofinas e que essa ligação desencadeia mecanismos relacionados principalmente à morte celular e degeneração axonal (LEE *et al.*, 2001; ROUX & BAKER, 2002). Estudos mostram que diferentes elementos do interstício cardíaco podem expressar p75, incluindo nervos, células de Schwann, células endoteliais e pericitos (ZHOU *et al.*, 2004; CAPORALI *et al.*, 2008b; SIAO et al 2012). Zhou e colaboradores (2004) observaram que, em coração de cães, a infusão de NGF elevou a expressão de p75 em elementos intersticiais, incluindo axônios simpáticos, e

células de Schwann. Segundo os autores, o crescimento de nervos simpáticos, nessa condição, foi regulado por NGF, principalmente via sua ligação ao p75. Habecker e colaboradores (2008) também demonstraram a importância de p75 para a manutenção da inervação simpática cardíaca. Ainda, foi demonstrado que tanto pró-NGF quanto pró-BDNF desencadeiam, via p75, desnervação simpática no miocárdio após o infarto (TENG *et al.*, 2010; LORENTZ *et al.*, 2013). Ainda, Caporali e colaboradores (2008) demonstraram papel do p75 na indução de apoptose em células endoteliais *in vitro*. Em coração de camundongos após lesão por isquemia, foi observado aumento da expressão de pró-NGF por cardiomiócitos e do receptor p75 por pericitos microvasculares. Foi sugerido que pró-NGF, via p75, provoca lesão e disfunção microvascular, que contribui para o desenvolvimento de cardiomiopatia (SIAO *et al.*, 2012). Assim, o aumento da expressão de p75 no coração dos animais chagásicos poderia, de alguma forma, relacionar-se com os processos degenerativos/regenerativos de nervos simpáticos e as disfunções endoteliais que ocorrem durante a infecção. A dosagem de proneurotrofinas, principalmente pró-NGF e pró-BDNF poderão trazer informações complementares sobre o papel do receptor p75 durante a infecção chagásica.

Estudos mostram que o balanço entre a sinalização via TrkA, TrkB e p75 podem definir o tônus simpático, em condições fisiológicas ou patofisiológicas e que mecanismos neurotróficos poderiam ter papel importante em alterações autonômicas que ocorrem em doenças cardíacas (CHALDAKOV *et al.*, 2004; ARIAS *et al.*, 2014). Acreditamos que os dados obtidos em nosso estudo contribuirão para a elucidação de fatores envolvidos com as mudanças adaptativas do sistema nervoso autonômico que ocorrem durante a infecção chagásica e que podem determinar a evolução das diferentes formas clínicas da doença, principalmente a forma cardíaca. Experimentos adicionais, envolvendo o reconhecimento dos alvos de NGF e BDNF e das vias de sinalização ativadas pelos receptores TrkA, TrkB e p75, certamente irão complementar as informações sobre o papel de neurotrofinas nos diferentes processos histopatogênicos que ocorrem ao longo da infecção. Importante, o entendimento do papel de fatores neurotróficos poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de pacientes chagásicos, esse aspecto já tendo sido explorado em diversas outras patologias (BARTUS & JOHNSON, 2017).

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a infecção chagásica, em ratos, promove desnervação autonômica importante na fase aguda da infecção, com redução da densidade de vesículas de neurotransmissores, tanto de varicosidades noradrenérgicas quanto colinérgicas. A densidade de vesículas é restaurada na fase crônica da infecção. Foi demonstrada também alteração na expressão das neurotrofinas NGF e BDNF, associada ao processo de desnervação autonômica. O aumento da expressão de NGF e seu receptor TrkA no miocárdio ocorre na fase aguda da infecção e parece ser importante para determinar a recuperação das terminações nervosas que ocorre na fase crônica. Já no caso do BDNF, uma maior responsividade aos níveis da neurotrofinas presentes no miocárdio, ocorre por aumento da expressão de seu receptor TrkB, a partir do início da fase crônica da infecção. O aumento da expressão do receptor de baixa afinidade para neurotrofinas, p75, indica uma participação do mesmo nos processos degenerativos e/ou regenerativos da inervação autonômica do miocárdio nessa condição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEVA, E. et al. NGF regulatory role in stress and coping of rodents and humans. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 65–72, 1996.
- ALMEIDA, E. A. DE et al. Infecção experimental de macacos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 1, p. 7–12, 1992
- ALOE, L. et al. Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 3, p. 294–303, 2015.
- ALOE, L.; SIMONE, M. D.; PROPERZI, F. Nerve growth factor: a neurotrophin with activity on cells of the immune system. **Microscopy Research and Technique**, v. 45, n. 4–5, p. 285–291, 1999.
- ALOE, L. et al. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 16, p. 6184–6187, 1986.
- ALVES, J. B.; MACHADO, C. O. R. S. Changes in acetylcholinesterase-positive nerves of the submandibular salivary gland during experimental infection with a protozoon, *trypanosoma cruzi*, in rats. **Archs oral Biol.**, v. 29, n. 8, p. 647–651, 1984.
- ALZOUBI, K. H. et al. Diabetes impairs synaptic plasticity in the superior cervical ganglion: Possible role for BDNF and oxidative stress. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 763–770, 2013.
- ANDRADE, Z. A. et al. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **American Heart Journal**, v. 95, n. 3, p. 316–324, 1978.
- ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 71–80, 1999.
- ARIAS, E. R. et al. Differential contribution of BDNF and NGF to long-term potentiation in the superior cervical ganglion of the rat. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 206–214, 2014.
- ARIDGIDES, D.; SALVADOR, R.; PEREIRAPERRIN, M. Trypanosoma cruzi Coaxes Cardiac Fibroblasts into Preventing Cardiomyocyte Death by Activating Nerve Growth Factor Receptor TrkA. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–11, 2013.
- ARMOUR JA, MURPHY DA, YUAN B, MACDONALD S, HOPKINS DA. Gross and Microscopic Anatomy of the Human Intrinsic Cardiac Nervous System. **Anatom Rec.** 1997;247:289-98.
- BAQUET, Z. C.; BICKFORD, P. C.; JONES, K. R. Brain-Derived Neurotrophic Factor Is Required for the Establishment of the Proper Number of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra Pars Compacta. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 26, p. 6251–6259, 2005.
- BARRAL, J.; CROIBIER, A. Manual therapy for the peripheral nerves, 1ed. Edinburgh: **New York: Churchill Livingstone / Elsevier**, 2007.
- BARBACID, M. Neurotrophic factors and their receptors. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 148–155, 1995.
- BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO journal**, v. 1, n. 5, p. 549–53, 1982.

BARROS, M. V et al. Doppler tissue imaging to evaluate early myocardium damage in patients with undetermined form of Chagas' disease and normal echocardiogram. **Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)**, v. 18, n. 2, p. 131–6, 2001.

BAROUCH, R. et al. Nerve growth factor regulates TNF- $\alpha$  production in mouse macrophages via MAP kinase activation of nerve growth factor ( NGF ) and its receptors in mouse macrophages and the mechanisms in- p75 . Treatment of J744 cells or peritoneal mac- during inflam. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. June, p. 1019–1026, 2001.

BARTUS, R. T.; JOHNSON, E. M. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? **Neurobiology of Disease**, v. 97, p. 156–168, 2017.

BEGNI, V.; RIVA, M. A.; CATTANEO, A. Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 131, n. 2, p. 123–138, 2016.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. BDNF and memory processing. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART C, p. 677–683, 2014.

BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy. **Cardiology Clinics**, v. 35, n. 1, p. 31–47, 2017.

BERRY, A.; BINDOCCI, E.; ALLEVA, E. NGF, brain and behavioral plasticity. **Neural Plasticity**, v. 2012, 2012.

BIBEL, M.; BARDE, Y. A. Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. **Genes and Development**, v. 14, n. 23, p. 2919–2937, 2000.

BLAIS, M. et al. Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3 and Glial-Derived Neurotrophic Factor Enhance Angiogenesis in a Tissue-Engineered *In Vitro* Model. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 15–16, p. 1655–1664, 2013.

BONECINI-ALMEIDA, M. et al. **Bonecini\_Almeida 1990.pdf** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1990.

BONINI, S. et al. Nerve growth factor: an important molecule in allergic inflammation and tissue remodelling. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 118, n. 2-4, p. 159–162, 1999.

BONINI, S. et al. Nerve growth factor: Neurotrophin or cytokine? **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 131, n. 2, p. 80–84, 2003.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1537–1547, 2015.

BOTHWELL, M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 1885, 2016.

BOYD, J. G.; GORDON, T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Molecular neurobiology**, v. 27, n. 3, p. 277–324, 2003.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 99–125,



2005.

BURNSTOCK, G. Autonomic neuromuscular junctions: current developments and future directions. **Journal of anatomy**, v. 146, n. June 1986, p. 1–30, 1986.

BUTLER, D. mobilização do Sistema nervosa, 1ª ed. São Paulo: **Manole**, 2003.

CAPORALI, A. et al. Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 2, p. 299–311, 2008.

CAMARGOS ERS, HAERTEL LRM, MACHADO CRS. Preganglionic fibers of the adrenal medulla and cervical sympathetic ganglia: differential involvement during experimental American trypanosomiasis in rats. **J. Exp. Pathol.**, 77: 115-124.1996.

CAPORALI, A., EMANUELI, C., Cardiovascular actions of neurotrophins. **Physiol Rev**. v. 89(1):279-308. 2009.

CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015\* Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015 Antônio Carlos Silveira (in memoriam) Joffre Marcondes de Rezende (in memoriam). **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 25, p. 7–86, 2016.

CHAGAS, C. **Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1909. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761909000200008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008)>

CHALDAKOV, G. N. et al. Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: A role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? **Progress in Brain Research**, v. 146, p. 279–289, 2004.

CHAN, A. et al. Circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF) and frequency of BDNF positive T cells in peripheral blood in human ischemic stroke: Effect on outcome. **Journal of Neuroimmunology**, v. 286, p. 42–47, 2015.

CHAPADEIRO E, FLORÊNCIO RF, AFONSO PC, BERALDO PS, DE JESUS PC, JUNQUEIRA JÚNIOR LF. Neuronal counting and parasympathetic dysfunction in the hearts of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected rats. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**.33:337-41.1991.

CHAO, V.M. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. **Nature Rev.**, 4:299-309.2003.

CHIBA & YAMAUCHI, 1970. On the Fine Structure of the Nerve Terminals in the Human Myocardium \*. *Z. Zellforsch*, **Department of Anatomy, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan, Z. Zellforsch.** 108, 324--388, 1970.

CHOW, L.T., CHOW, S.S., ANDERSON, R.H., GOSLING, J.A., 1995. The innervation of the human myocardium at birth. **J. Anat.** 187, 107–114.

CIRULLI, F.; ALLEVA, E. The NGF saga: From animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 3, p. 379–395, 2009.

CONNER, J. M. et al. Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 7, p. 2295–2313, 1997.

COOTE, J.H. & CHAUHAN, R.A., 2016. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical The sympathetic innervation of the heart: Important new insights.** *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2016.08.014>.

COPRAY, S. et al. Contraction-induced muscle fiber damage is increased in soleus muscle of streptozotocin-diabetic rats and is associated with elevated expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in muscle fibers and activated satellite cells. **Experimental neurology**, v. 161, n. 2, p. 597–608, 2000.

COSTA, H. S. et al. Effect of acute aerobic exercise on serum BDNF levels in patients with Chagas heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 174, n. 3, p. 828–830, 2014.

COSTANTINI F, SHAKYA R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. **Bioessays**. 2006; v. 28(2): 117-27. 2006.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. i, p. 31–40, 2009.

COURA, J. R. et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 171–176, 2002.

DA SILVA, A. M. et al. Evaluation of the Rabbit as a Model for Chagas Disease - II. Histopathologic Studies of the Heart, Digestive Tract and Skeletal Muscle. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 199–206, 1996.

DASTUR, D.K., VEVAINA, S.C. & MANGHANI, D.K., 1989. **Fine structure of A: autonomic nerve fibers and terminals in human myocardium; and B: myocardial changes in congenital heart disease.** *Ultrastructural pathology*, 13(4), pp.413–31.

DAVILA, D. F. et al. Cardiac Parasympathetic Disease Innervation in Chagas' Heart. **Circulation Research**, p. 80–84, 1991.

DÁVILA, D. F. et al. Cardiac autonomic control mechanisms in the pathogenesis of Chagas' heart disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, 2012.

DÁVILA, D. F.; INGLESSIS, G.; MAZZEI DE DÁVILA, C. A. Chagas' heart disease and the autonomic nervous system. **International journal of cardiology**, v. 66, n. 2, p. 123–7, 1998.

DIAS, J.C.P., The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. **Rev Soc Bras Med Trop**; v.22: 147-56. 1989.

DIAS JC, J.R. COURA. Epidemiologia. In: Clínica e Terpaêutica da Doença de Chagas. Eds: Dias, JC & Coura, JR, **Editora Fiocruz**, Rio de Janeiro, Brasil. 1997.

DINIZ, B. S.; TEIXEIRA, A. L. Brain-derived neurotrophic factor and Alzheimer's disease: Physiopathology and beyond. **NeuroMolecular Medicine**, v. 13, n. 4, p. 217–222, 2011.

DONOVAN, M. J. et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival

- factor required for intramyocardial vessel stabilization. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 21, p. 4531–4540, 2000.
- EDELMANN, E.; LESSMAN, V.; BRIGADSKI, T. Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART C, p. 610–627, 2013.
- EMANUELI, ET AL. The Biology of Neurotrophins: Cardiovascular Function. In: **Experimental Pharmacology**. [s.l.: s.n.]. v. 220p. 309– 328.
- ESPER, L. et al. Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 246–252, 2015.
- FENG, N. et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 6, p. 1880–5, 2015.
- FENG, N. et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 6, p. 1880–5, 2015.
- FILLENZ, M.; POLLARD, R. Research reports. **Brain Research**, v. 109, p. 443–454, 1976.
- FILLENZ, M.; STANFORD, S. C. VESICULAR NORADRENALINE STORES IN PERIPHERAL NERVES OF THE RAT AND THEIR MODIFICATION BY TRANYLCTYPROMINE. **Br. J. Pharmac.**, v. 73, p. 401–404, 1981.
- FOUDA, A. Y. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Knockdown Blocks the Angiogenic and Protective Effects of Angiotensin Modulation After Experimental Stroke. **Molecular Neurobiology**, p. 1–10, 2016.
- FRANCIS, N. et al. NT-3, like NGF, is required for survival of sympathetic neurons, but not their precursors. **Dev Biol**, v. 210, n. 2, p. 411–427, 1999.
- FREITAS, H. F. G. et al. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: Role of Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 102, n. 2, p. 239–247, 2005.
- FREITAS, A. F. Sistema nervoso autônomo e aparelho cardiovascular: um paradigma de auto-organização, complexidade e caos. **Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian**, 1999.
- FUJIMURA, H. et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 87, n. 4, p. 728–734, 2002.
- FULGENZI, G. et al. BDNF modulates heart contraction force and long-term homeostasis through truncated TrkB.T1 receptor activation. **Journal of Cell Biology**, v. 210, n. 6, p. 1003–1012, 2015.
- FUNAKOSHI H, FRISEN J, BARBANY G, TIMMUSK T, ZACHRISSON O, VERGE VM, PERSSON H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. **J Cell Biol**, v.123:455–465. 1993.
- GAO, M. et al. BDNF gene delivery within and beyond templated agarose multi-channel guidance scaffolds enhances peripheral nerve regeneration. **Journal of Neural**

**Engineering**, v. 13, n. 6, p. 66011, 2016.

GIBBINS, I. L. Cell and Tissue Lack of correlation between ultrastructural and pharmacological types of non-adrenergic autonomic nerves. **Cell Tissue Research**, v. 221, p. 551–581, 1982.

GILBERT, M. E.; LASLEY, S. M. Developmental thyroid hormone insufficiency and brain development: A role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF)? **Neuroscience**, v. 239, p. 253–270, 2013.

GORDON, T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. **Journal of Communication Disorders**, v. 43, n. 4, p. 265–273, 2010.

GORDON, L., WHARTON, J., GAER, J.A., INGLIS, G.C., TAYLOR, K.M., POLAK, J.M., 1993. **Quantitative immunohistochemical assessment of bovine myocardial innervation before and after cryosurgical cardiac denervation**. *Cardiovasc. Res.* 27, 318–326.

GOTTMANN, K.; MITTMANN, T.; LESSMANN, V. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. **Experimental Brain Research**, v. 199, n. 3–4, p. 203–234, 2009.

GOVONI, S. et al. NGF and heart: Is there a role in heart disease? **Pharmacological Research**, v. 63, n. 4, p. 266–277, 2011.

GUERRA, ET AL., 2001. Cyclophosphamide-induced immunosuppression nerve terminals from damage by Trypanosoma protects cardiac noradrenergic cruzi infection in adult rats. **Blood**, p. 505–509, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HABECKER, B. A. . ET AL. Regulation of cardiac innervation and function via the p75 neurotrophin receptor Beth. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 140, n. 1-2, p. 40–48, 2008.

HALLBÖÖK, F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, n. 5, p. 616–621, 1999.

HAN, T. Y. et al. Intestinal smooth muscle phenotype determines enteric neuronal survival via GDNF expression. **Neuroscience**, v. 290, p. 357–368, 2015.

HARRINGTON, A. W.; GINTY, D. D. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 3, p. 177–187, 2013

HASAN, W. et al. Sympathetic hyperinnervation and inflammatory cell NGF synthesis following myocardial infarction in rats. **Brain Research**, v. 1124, n. 1, p. 142–154, 2006.

HASAN, W. Autonomic cardiac innervation: development and adult plasticity. **Organogenesis**, v. 9, n. 3, p. 176–193, 2013.

HAYAKAWA, T. et al. Brain-derived neurotrophic factor immunoreactive vagal sensory neurons innervating the gastrointestinal tract of the rat. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 61, p. 83–87, 2014.

HAZARI, M. S.; PAN, J. H.; MYERS, A. C. Nerve growth factor acutely potentiates

synaptic transmission in vitro and induces dendritic growth in vivo on adult neurons in airway parasympathetic ganglia. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 292, n. 4, p. L992–L1001, 2007.

HE, Y. Y. et al. Role of BDNF in central motor structures and motor diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 783–793, 2013.

HELAN, M. et al. BDNF secretion by human pulmonary artery endothelial cells in response to hypoxia. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 68, p. 89–97, 2014.

HEMPSTEAD, B. L. The many faces of p75NTR. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 3, p. 260–267, 2002.

HEMPSTEAD, B. L. Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. **Current Alzheimer research**, v. 3, n. 1, p. 19–24, 2006.

HEUMANN, R. et al. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 23, p. 8735–9, 1987.

HIGUCHI, M. L. et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clinical cardiology**, v. 10, n. 11, p. 665–670, 1987.

HILTUNEN, J. O. et al. Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. **The Journal of pathology**, v. 194, n. 2, p. 247–53, 2001.

HIRUMA, H.; HIKAWA, S.; KAWAKAMI, T. Immunocytochemical colocalization of fibroblast growth factor-1 with neurotrophin-3 in mouse alveolar macrophages. **Acta histochemica and cytochemica**, v. 45, n. 2, p. 131–7, 2012.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, 2008.

IANNI, B. M. et al. Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 77, n. 1, p. 59–62, 2001.

IANNI & MADY. Forma indeterminada da doença de chagas. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**, v. 68, n. n° 3, p. 135–141, 1997.

IEDA, M. et al. Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 6, p. 876–884, 2004.

IEDA, M. ET AL., 2008. **Regulation of cardiac nerves: a new paradigm in the management of sudden cardiac death?** Current medicinal chemistry, 15(17), pp.1731–1736.

IEDA, M. & FUKUDA, K., 2009. **New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: the regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance.** Journal of pharmacological sciences, 109(3), pp.348–53.

- IEDA, M., 2013. Heart Development and Regeneration via Cellular Interaction. **The Keio Journal of Medicine**, V. 62(4 p.), pp.99–106. Available at: <http://doi:10.2302/kjm.2012-0020-RE> .
- IP, N. Y. et al. Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. **Neuron**, v. 10, n. 2, p. 137–149, 1993.
- IP, N. Y. et al. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 7, p. 3060–3064, 1992.
- JAMALI, H.K., WAQAR, F. & GERSON, M.C., 2016. **Cardiac autonomic innervation**. *Journal of Nuclear Cardiology*, 14, pp.1–13.
- JELICKS, L. A.; TANOWITZ, H. B. **Advances in Imaging of Animal Models of Chagas Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2011. v. 75
- JOHNSON, E. O.; CHARCHANTI, A.; SOUCACOS, P. N. Nerve repair: Experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. **Injury**, v. 39, n. 3 SUPPL., p. 34–37, 2008.
- JUNQUEIRA, L. F.; SOARES, J. D. Impaired autonomic control of heart interval changes to Valsalva manoeuvre in Chagas' disease without overt manifestation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 97, n. 1, p. 59–67, 2002.
- JUNQUEIRA JUNIOR, L. F. Insights into the clinical and functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 243–252, 2012.
- KAPLAN, D. R. et al. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 252, n. 5005, p. 554–558, 1991.
- KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 3, p. 381–391, 2000.
- KARNOVSKY, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27:137-138.
- KAWASHIMA, T., 2005. **The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution**. *Anatomy and Embryology*, 209(6), pp.425–438.
- KAYE, D. M. et al. Reduced myocardial nerve growth factor expression in human and experimental heart failure. **Circulation Research**, v. 86, n. 7, p. E80-4, 2000.
- KERMANI, P. et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB + endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 653–663, 2005.
- KERSCHENSTEINER, M. et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 5, p. 865–870, 1999.
- KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 210–223, 1999.
- KIMURA, K. et al. Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes

cardiac sympathetic denervation in severe heart failure. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 156, n. 1–2, p. 27–35, 2010.

KLEIN, R. et al. The MB Tyrosine Protein Kinase Is a Receptor for Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3. v. 66, 1991a.

KLEIN, R. et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 395–403, 1991.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv. Parasitol**, n. 6, p. 63–116, 1968.

KONDO, Y. et al. Role of TrkB expression in rat adrenal gland during acute immobilization stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 2, p. 224–232, 2013.

KORSCHING, S.; THOENEN, H. Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 11, p. 3513–3516, 1983.

KREUSSER, M. M. et al. Differential expression of cardiac neurotrophic factors and sympathetic nerve ending abnormalities within the failing heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, n. 2, p. 380–387, 2008.

KRITASL, S. K. et al. Nerve Growth Factor Interactions With Mast Cells. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology Editorial**, v. 27, n. I, p. 15–19, 2014.

KYÖSOLA, K. et al., 1976. Fluorescence histochemical and electron-microscopical observations on the innervation of the atrial myocardium of the adult human heart. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology**, 371(2), pp.101–119.

LAMBALLE, F.; KLEIN, R.; BARBACID, M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. **Cell**, v. 66, n. 5, p. 967–979, 1991.

LANNI, C. et al. The Expanding Universe of Neurotrophic Factors: Therapeutic Potential in Aging and Age-Associated Disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 6, p. 698–717, 2010.

LASKE, C. et al. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 9, p. 1217–1224, 2006.

LEE, R. et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5548, p. 1945–1948, 2001.

LEWIN GR, BARDE YA. Physiology of the neurotrophins. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 19; 289– 317. 1996.

LIMA, M. M. O. et al. Improvement of the functional capacity is associated with BDNF and autonomic modulation in Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 167, n. 5, p. 2363–2366, 2013.

LINDHOLM, P.; SAARMA, M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. **Developmental Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 360–371, 2010.

LINDSAY, R. M.; YANCOPOULOS, G. D. GDNF in a bind with known orphan: Accessory implicated in new twist. **Neuron**, v. 17, n. 4, p. 571–574, 1996.

LINHER-MELVILLE, K.; LI, J. The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor,

brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 145, n. 2, p. R43-54, 2013.

LINKER, R. A. et al. Functional role of brain-derived neurotrophic factor in neuroprotective autoimmunity: therapeutic implications in a model of multiple sclerosis. **Brain**, v. 133, n. Pt 8, p. 2248–2263, 2010.

LINKER, R.; GOLD, R.; LUHDER, F. Function of Neurotrophic Factors Beyond the Nervous System. **CritRevImmunl**, v. 29, n. 1, p. 43–68, 2009.

LOPES, E. R.; TAFURI, W. L. INVOLVEMENT OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM IN CHAGAS HEART DISEASE. p. 206–212, 1983.

LORENTZ, C. U. et al. Sympathetic denervation of peri-infarct myocardium requires the p75 neurotrophin receptor. **Experimental Neurology**, v. 249, p. 111–119, 2013.

LUTHER, J. A.; ENES, J.; BIRREN, S. J. Neurotrophins regulate cholinergic synaptic transmission in cultured rat sympathetic neurons through a p75-dependent mechanism. **Journal of Neurophysiology**, n. October 2012, p. 485–496, 2012.

LYKISSAS, M. G. et al. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. **Current neurovascular research**, v. 4, n. 2, p. 143–151, 2007.

MACHADO CR, MACHADO AB, CHIARI CA. Recovery from heart norepinephrine depletion in experimental Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg.**27:20-4. 1978.

MACHADO ABM, MACHADO CRS, GOMES CB. *Trypanosoma cruzi*: acetylcholine content and cholinergic innervation of the heart in rats. **Exp. Parasitol.**, 47: 107-115. 1979.

MACHADO CRS, RIBEIRO ALP. Experimental American trypanosomiasis in rats: sympathetic denervation, parasitism and inflammatory process. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84(4): 549-556. 1989.

MACHADO CRS, CAMARGOS ERS, GUERRA LB, MOREIRA MCV. Cardiac autonomic denervation in congestive heart failure: comparison of Chagas' heart disease with other dilated cardiomyopathy. **Hum. Pathol.**, 31: 3-10. 2000.

MACHADO CRS, GOMEZ MV, MACHADO AB. Changes in choline acetyltransferase activity of rat tissues during Chagas' disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 20: 697-702.1987.

MADY, C. et al. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, n. 6, p. 3098–102, 1994.

MAHMUD, MAHMUD AHMAD ISMAIL et al. Relação entre tensão neural adversa e estudos de condução nervosa em pacientes com sintomas da síndrome do túnel do carpo. **Arq. Neuro. Psiquiatr.** São Paulo, v. 64, n. 2ª. June 2006.

MAISONPIERRE, P. C. et al. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: Gene structures, distributions, and chromosomal localizations. **Genomics**, v. 10, n. 3, p. 558–568, 1991.

MALDONADO, I. R. S. C. et al. Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi*-induced myositis in rats. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 1, p. 85–93, 2004.

MANESS, L. M. et al. The neurotrophins and their receptors: Structure, function, and neuropathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 18, n. 1, p. 143–159,



1994.

MARCOL, W. et al. BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. **Neurosurgical Review**, v. 30, n. 3, p. 235–243, 2007.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MARKUS, A.; PATEL, T. D.; SNIDER, W. D. Neurotrophic factors and axonal growth. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 5, p. 523–531, 2002.

MARTINELLI, P. M. et al. Cardiac NGF and GDNF expression during *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 130, n. 1–2, p. 32–40, 2006.

MARTINELLI, P. M. et al. Brain-derived neurotrophic factor is up regulated in chronic Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 149, n. 2, p. 277–278, 2011.

MARTINS, R. F. et al. Protein deficiency alters CX3CL1 and endothelin-1 in experimental *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyopathy. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 4, p. 466–476, 2013.

MATSUOKA, I.; MEYER, M.; THOENEN, H. Cell-type-specific regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in non-neuronal cells: comparison of Schwann cells with other cell types. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 3165–3177, 1991.

MCKELVEY, L.; SHORTEN, G. D.; O'KEEFFE, G. W. Nerve growth factor-mediated regulation of pain signalling and proposed new intervention strategies in clinical pain management. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 3, p. 276–289, 2013.

MELO, R. C. N.; R.S. MACHADO, C. Depletion of radiosensitive leukocytes exacerbates the heart sympathetic denervation and parasitism in experimental Chagas' disease in rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 84, n. 2, p. 151–157, 1998.

MELONI, M. et al. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 106, n. 7, p. 1275–1284, 2010.

MENDELLELL, M. Neurotrophins and sensory neurons: role in development, maintenance and injury. A thematic summary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **Biological Sciences**, v. 351, 463–467.1996.

MENEZES JUNIOR, ANTÔNIO DA SILVA; MOREIRA, HUMBERTO GRANER; DAHER, MURILO TAVARES. Análise da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes hipertensos, antes e depois do tratamento com inibidores da enzima conversora da angiotensina II. **Arq. Bras. Cardiol.** São Paulo, v. 83. n. 2. Aug. 2004.

MEYER, M; MATSUOKA, I; WETMORE, C; OLSON, L; THOENEN, H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for regulation of BDNF and NGF mRNA. **J. Cell Biol.**, 119: 45-54. 1992.

MICERA, A. et al. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkANGFR and p75NTR, two receptors one fate. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 3–4, p. 245–256, 2007.

MING, M. et al. Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: possible contribution to therapeutic effects of RPE cell

- transplantation in Parkinson's disease. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 4, p. 53, 2009.
- MINICHELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 850–60, 2009.
- MISCHEL, P. S. et al. The Extracellular Domain of p75NTR Is Necessary to Inhibit Neurotrophin-3 Signaling through TrkA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11294–11301, 2001.
- MITRANI, R.D., ZIPES, D.P., 1994. **Clinical Neurocardiology: Arrhythmias. In:** Armour, J.A., Ardell, J.L. (Eds.), *Neurocardiology*. Oxford University Press, New York, pp. 365–395.
- MITRE, M.; MARIGA, A.; CHAO, M. V. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clinical Science**, v. 131, n. 1, p. 13–23, 2016.
- MOK, S. A.; CAMPENOT, R. B. A nerve growth factor-induced retrograde survival signal mediated by mechanisms downstream of TrkA. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 270–278, 2007.
- MONCAYO, A. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 401–404, 1999.
- MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577–591, 2003.
- MÜLLER, D. et al. The expression of neurotrophins and their receptors in the prenatal and adult human testis: Evidence for functions in Leydig cells. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 126, n. 2, p. 199–211, 2006.
- NICO, B. et al. Nerve growth factor as an angiogenic factor. **Microvascular Research**, v. 75, n. 2, p. 135–141, 2008.
- NISHI, R. Target-derived molecules that influence the development of neurons in the avian ciliary ganglion. **Journal of Neurobiology**, v. 25, n. 6, p. 612–619, 1994.
- NOGA, O. et al. The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, n. 5, p. 649–654, 2003.
- NOVAES, R. D. et al. Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuates cardiac morphofunctional remodeling in experimental Chagas cardiomyopathy. **Life Sciences**, v. 152, p. 210–219, 2016.
- PAPARIDIS, CD. Expressão do Fator de Crescimento Neural na glândula submandibular durante a fase aguda da infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação de mestrado. 2005**. Pós-Graduação em Biologia Celular da UFMG.
- PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 7–23, 2013.
- PARLAKIAN, A. et al. Intermediate filaments in peripheral nervous system: Their expression, dysfunction and diseases. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 10, p. 607–613, 2016.

PASCHOAL, MA et al. Variabilidade da frequência cardíaca em diferentes faixas etárias. **Revista bras. Fisioter.** São Carlos, v. 10, n. 4, Dec, 2006.

PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 3, p. 272–280, 2001.

PAUZIENE, N., PAUZA, D.H. & Stropus, R., 2000. Morphology of human intracardiac nerves: an electron microscope study. **Journal of anatomy**, 197 Pt 3, pp.437–59.

PLUCHINO, N. et al. Steroid hormones and BDNF. **Neuroscience**, v. 239, p. 271–279, 2013.

PETZOLD, A. Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 233, n. 1-2, p. 183–198, 2005.

PUMPRLA, S. K; HOWLEY, E. S. Fisiologia do exercício. 3ª ed. São Paulo: **Manole**, 2000.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

PRINCE, F. P. Ultrastructural evidence of adrenergic, as well as cholinergic, nerve varicosities in relation to the lamina propria of the human seminiferous tubules during childhood. **Tissue and Cell**, v. 28, n. 5, p. 507–513, 1996.

RANA, O. R. et al. Regulation of nerve growth factor in the heart: The role of the calcineurin-NFAT pathway. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, n. 4, p. 568–578, 2009.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: Pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 152–158, 2009.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545–1564, 2006.

RIBEIRO, A. L. P. et al. Power-law behavior of heart rate variability in Chagas' disease. **American Journal of Cardiology**, v. 89, n. 4, p. 414–418, 2002.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 301–314, 1998.

RIBEIRO, A L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 301–314, 1998.

ROSSI, M. A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **International journal of cardiology**, v. 30, n. 3, p. 335–340, 1991.

ROSSI, M. A.; GONÇALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **The American Journal of Pathology**,

v. 114, n. 2, p. 209–216, 1984.

ROUX, P. P.; BARKER, P. A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 3, p. 203–233, 2002.

SAHENK, Z. Neurotrophins and Peripheral Neuropathies THERAPY OF PERIPHERAL. 2006.

SANTOS, D. et al. Preferential Enhancement of Sensory and Motor Axon Regeneration by Combining Extracellular Matrix Components with Neurotrophic Factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 65, 2016.

SARUTA, J.; SATO, S.; TSUKINOKI, K. The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 10, p. 1317–1330, 2010.

SAYGILI, E. et al. Electrical stimulation of sympathetic neurons induces autocrine/paracrine effects of NGF mediated by TrkA. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 49, n. 1, p. 79–87, 2010.

SCARISBRICK, I. A.; JONES, E. G.; ISACKSON, P. J. Coexpression of mRNAs for NGF, BDNF, and NT-3 in the cardiovascular system of the pre- and postnatal rat. **J Neurosci**, v. 13, n. 3, p. 875–893, 1993.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 75–85, 2007.

SCURI, M.; SAMSELL, L.; PIEDIMONTE, G. The role of neurotrophins in inflammation and allergy. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 9, n. 3, p. 173–180, 2010.

SEBBEN, A. D.; LICHTENFELS, M.; DA SILVA, J. L. B. Peripheral Nerve Regeneration: Cell Therapy and Neurotrophic Factors. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 46, n. 6, p. 643–649, 2011.

SEGAL, R. A.; GREENBERG, M. E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. **Annu Rev Neurosci**, v. 19, p. 463–489, 1996.

SERRA-MILLÀS, M. Are the changes in the peripheral brain-derived neurotrophic factor levels due to platelet activation? **World journal of psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 84–101, 2016.

SIAO, C.-J. et al. ProNGF, a cytokine induced after myocardial infarction in humans, targets pericytes to promote microvascular damage and activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 12, p. 2291–2305, 2012.

SILVA LH, NUSSENZWEIG V 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin Biol** 20: 191-207.

SINGH, K. K. et al. Developmental axon pruning mediated by BDNF-p75NTR-dependent axon degeneration. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 649–658, 2008.

SLEEMAN MW, ANDERSON KD, LAMBERT PD ET AL. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. **Pharm Acta Helv**, 74(2-3): 265-272. 2000.

SMOLEN, A. J. Morphology of synapses in the autonomic nervous system - Smolen -

- 2005 - Journal of Electron Microsc. **Journal of electron microscopy technique**, v. 10:187- 20, p. 187–204, 1988.
- SOFRONIEW, M. V; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. N Erve G Rowth F Actor S Ignaling , N Europrotection , and N Eural R Epair. **Brain**, v. 24, p. 1217–81, 2001.
- SORNELLI, F. et al. Adipose tissue-derived nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor : results from experimental stress and diabetes. **Neurobiology**, v. 1, p. 179–183, 2009.
- SQUINTO, S. P. et al. trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 885–893, 1991.
- TAFURI, W. L. ; ET AL. Comunicação o cão como modelo experimental para o estudo da história natural da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 2, p. 77, 1988.
- TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and chagas disease: Some mechanisms and relevance. **Advances in Parasitology**, v. 76, p. 171–194, 2011.
- TANILA, H. The role of BDNF in Alzheimer’s disease. **Neurobiology of Disease**, 2016.
- TANOWITZ, H. B. et al. Chagas’ disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 5, n. 4, p. 400–19, 1992.
- TANOWITZ, H. B. et al. Compromised Microcirculation in Acute Murine Trypanosoma cruzi Infection Stephen M . Factor , Louis M . Weiss and Murray Wittner. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 124–130, 1996.
- TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463–491, 2006.
- TENG, K. K. et al. Understanding Proneurotrophin Actions: Recent Advances and Challenges. **Dev Neurobiol.**, v. 70, n. 5, p. 350–359, 2010.
- TERENGI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of anatomy**, p. 1–14, 1999.
- TIMMUSK, T. et al. Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. **The European journal of neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 605–13, 1993.
- TOMELLINI, E. et al. Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: More than just a marker. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 13, p. 2467–2481, 2014.
- TORRES, F. W. et al. Coronary vascular reactivity is abnormal in patients with Chagas’ heart disease. **American Heart Journal**, v. 129, n. 5, p. 995–1001, 1995.
- TOSTES, S. et al. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas’ disease. **International Journal of Cardiology**, v. 99, n. 2, p. 233–237, 2005.
- TRANG, T.; BEGGS, S.; SALTER, M. W. Brain-Derived Neurotrophic Factor from glia: A Molecular substrate for neuropathic pain. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 1, p. 99–108, 2011.

TWISS, J. L.; CHANG, J. H.; SCHANEN, N. C. Pathophysiological Mechanisms for Actions of the Neurotrophins \ndoi:10.1111/j.1750-3639.2006.00039.x. **International Society of Neuropathology, Brain Pathology**, v. 16, n. 4, p. 320–332, 2006.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 2001.

UELLENDAHL, M. et al. Cardiac magnetic resonance-verified myocardial fibrosis in chagas disease: Clinical correlates and risk stratification. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 5, p. 460–466, 2016.

VERGE, V. M. K. et al. Mechanisms of disease: Role of neurotrophins in diabetes and diabetic neuropathy. **Elsevier B.V.**, v. 126. Chapter 29, 2014.

VÖGELIN, E. et al. Effects of local continuous release of brain derived neurotrophic factor (BDNF) on peripheral nerve regeneration in a rat model. **Experimental Neurology**, v. 199, n. 2, p. 348–353, 2006.

WATANABE, T. et al. Brain-derived neurotrophic factor expression in asthma association with severity and type 2 inflammatory processes. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 53, n. 6, p. 844–852, 2015.

WEIGAND, L. A.; KWONG, K.; MYERS, A. C. The effects of nerve growth factor on nicotinic synaptic transmission in mouse airway parasympathetic neurons. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 53, n. 4, p. 443–449, 2015.

WIDIAPRADJA, A.; CHUNDURI, P.; LEVICK, S. P. The role of neuropeptides in adverse myocardial remodeling and heart failure. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

WILASCO, M. I. A. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Children and Adolescents with Cirrhosis Due to Biliary Atresia. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 69, n. 1, p. 1–8, 2016.

YAMAMOTO, H.; GURNEY, M. E. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. **J Neurosci**, v. 10, n. November, p. 3469–3478, 1990.

YAMAUCHI, C. AND. On the Fine Structure of the Nerve Terminals in the Human Myocardium \*. *Z. Zellforsch*, **Department of Anatomy, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan**, v. 108, p. 324–388, 1970.

YANG, B.; SLONIMSKY, J. D.; BIRREN, S. J. A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 539–545, 2002.

YI, S. et al. Regulation of Schwann cell proliferation and migration by miR-1 targeting brain-derived neurotrophic factor after peripheral nerve injury. **Scientific reports**, v. 6, n. July, p. 29121, 2016.

YUAN, M. J.; HUANG, H.; HUANG, C. X. P75 neurotrophin receptor is a regulatory factor in sudden cardiac death with myocardial infarction. **Med Hypotheses**, v. 79, n. 3, p. 361–362, 2012.

YUZWA, S. A. et al. Proneurogenic Ligands Defined by Modeling Developing Cortex Growth Factor Communication Networks. **Neuron**, v. 91, n. 5, p. 988–1004, 2016.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 340 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Caracterização ultraestrutural de terminações nervosas e expressão de neurotrofinas no coração de ratos infectados com Trypanosoma cruzi”, que tem como responsável Patricia Massara Martinelli, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 03/03/2015. Este certificado espira-se em 03/03/2020.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 340 / 2014, related to the Project entitled “Ultrastructural characterization of nerve terminals and neurotrophin expression in Trypanosoma cruzi-infected rat heart. ”, under the supervision of Patricia Massara Martinelli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/03/2015. This certificates expires in 03/03/2020.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 03/03/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpa.ufmg.br](mailto:cetea@prpa.ufmg.br)