

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E
INFECTOLOGIA

Marília Beatriz de Cuba

PAPEL DA INERVAÇÃO SENSORIAL MEDIADA POR FIBRAS
NERVOSAS TIPO C NA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA EM
CAMUNDONGOS

Uberaba, MG
Setembro - 2019

MARILIA BEATRIZ DE CUBA

**PAPEL DA INERVAÇÃO SENSORIAL MEDIADA POR FIBRAS
NERVOSAS TIPO C NA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA EM
CAMUNDONGOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor (a) em Medicina Tropical e Infectologia. Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Uberaba, MG
Setembro – 2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

C97p Cuba, Marília Beatriz de
Papel da inervação sensorial mediada por fibras nervosas tipo C na Doença de Chagas aguda em camundongos / Marília Beatriz de Cuba. -- 2019.
105 f. : il., graf., tab.

Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Infectologia) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019
Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

1. Doença de chagas. 2. Neuroimunomodulação. 3. Resistência à doença. 4. Suscetibilidade a doenças. I. Silva, Valdo José Dias da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.937

Marília Beatriz de Cuba

PAPEL DA INERVAÇÃO SENSORIAL MEDIADA POR FIBRAS NERVOSAS
TIPO C NA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor (a) em Medicina Tropical e Infectologia. Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicada.

18 de Setembro de 2019

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba

Prof. Dra. Karine Rezende de Oliveira

Universidade Federal de Uberlândia - Ituiutaba

Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Ribeirão Preto

Prof. Dra. Eliane Lages Silva

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba

Dr. Virmondés Rodrigues Júnior

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos que participaram deixando um pouco de si...

Dedico não só esse trabalho, mas a minha vida ao meu núcleo familiar, minhas filhas, Maria Luísa e Gabrielle, e meu esposo, Marcus Paulo, por estarem sempre ao meu lado e principalmente por entenderem tantas ausências...

Dedico a minha grande família pais e irmãos, por terem me dado valores, por terem me formado essa pessoa insistente, curiosa e determinada, por todo apoio e incentivo...

Dedico ao meu orientador prof. Valdo, o qual continuo tendo grande admiração e respeito, admiração pelo seu potencial intelectual-científico, essa mente brilhante, por ser esse grande pesquisador, além de conseguir ser ao mesmo tempo “humano”, só quem conhece sabe disso...

Dedico ao Marcus Paulo, pelo fato de caminhar ao meu lado sendo a minha motivação nos momentos difíceis, pelo seu potencial intelectual e incentivo, por ser esse ser humano que caminha incansavelmente nessa luta pela pesquisa, por esse brilho no olhar a cada proposta, a cada hipótese, a cada descoberta de um resultado, enfim por essa vontade de fazer pesquisa e por ser esse Pesquisador brilhante ...

AGRADECIMENTOS

“Seus dias são marcas no caminho evolutivo”.

(André Luiz)

Agradeço primeiramente à Deus, pela minha existência e papel funcional na vida. Por ter me permitido capacitação e discernimento do bem, do ético e do correto, para exercer funções de trabalho relacionadas a pesquisa, por me permitir ter companheiros espirituais que me auxiliam em todos os momentos e decisões. Por ter me guiado a lugares e encontro de pessoas com objetivos afins, sempre caminhando do lado do bem, oferecendo-me possibilidades de estudo e conhecimento para minha evolução e crescimento, espiritual, pessoal e profissional...;

Agradecimento à minha família, meus pais e irmãos, por todo amor, companheirismo, apoio e auxílio quando necessário;

Às minhas filhas, pelo simples fato de existirem e assim me permitirem doar e receber todo esse amor, peço desculpas pelas ausências e agradeço pelo carinho, pelos abraços, sorrisos, momentos de descobertas e de aprendizagem sobre a “vida”...;

Ao Marcus Paulo pelo amor, dedicação e companheirismo, por ter estado presente todo esse tempo ao meu lado no trabalho e na vida, caminhando juntos mesmo nos momentos difíceis e de opiniões opostas, pelo auxílio com tão grande conhecimento intelectual e científico...;

Ao meu orientador, Prof. Valdo, pelo apoio, pelo conhecimento e sabedoria, pela paciência diante da minha ansiedade e confiança no meu trabalho, pela oportunidade de desenvolvimento profissional, e conseqüentemente pessoal, intelectual e espiritual;

À equipe técnica e colegas do laboratório de fisiologia, imunologia e parasitologia;

À equipe do Laboratório de Imunologia de Transplantes São Paulo pelo auxílio quando foi necessário;

Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia que colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho, Lucas Felipe, Angélica Cristina, Glauco, Thaís Farnesi, Donizete, Tiago Alvares;

Ao Marcelo secretário da pós-graduação e amigo, pelo apoio, auxílio e palavras de incentivo;

Ao prof. André Luiz Pedrosa pelo apoio e paciência com as minhas ausências e também agradeço as minhas colegas do laboratório multiusuário pelo apoio, Lucila e Raíssa;

À prof.^a Eliane Lages Silva, pessoa que admiro pelo seu conhecimento intelectual e científico, mas além disso como “ser humano”. Obrigada pelo auxílio, incentivo e pela contribuição no trabalho, pela oportunidade a momentos de conversa e discussões, sempre com carinho e paciência.

À minha querida amiga Elizabete Perez, por todas as informações, pelo carinho e incentivo e amizade;

À minha querida amiga que a vida me deu, Anna Neri, pelo incentivo e apoio sempre com muito carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa por dois anos.

(...)

Hoje me sinto mais forte

Mais feliz, quem sabe

Só levo a certeza

De que muito pouco sei

Ou nada sei

(...)

É preciso amor

Pra poder pulsar

É preciso paz pra poder sorrir

É preciso a chuva para florir

(...)

Cada um de nós compõe a sua história

Cada ser em si

Carrega o dom de ser capaz

E ser feliz

Tocando em frente (Almir Sater / Renato Teixeira)

RESUMO

A evolução de uma doença durante a infecção por um determinado agente parasitário é criticamente influenciada pelas interações dinâmicas e recíprocas entre os mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa do hospedeiro contra o parasito e as estratégias parasitárias de evasão e resistência à imunidade protetora. Evidências clínicas e experimentais publicadas na literatura científica demonstram uma influência crítica do sistema nervoso central e periférico sobre a organização da resposta comportamental imunológica em diversos contextos imunogênicos, tais como doenças infecciosas, câncer, transplante, autoimunidade etc. Dados experimentais coletados pelo nosso grupo apontam que o sistema nervoso autônomo, tanto simpático quanto parassimpático, é um elemento chave na dinâmica da relação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro que, em última análise, determina o curso da infecção e a evolução da patogênese provocada pelo protozoário, nas fases aguda e crônica da doença de Chagas. Contudo, o possível papel funcional de vias e circuitos neurais sensoriais nos mecanismos imunológicos responsáveis por promover um perfil de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro tanto ao parasito quanto à miocardite chagásica aguda, para o nosso conhecimento, nunca foi investigado. Do exposto, a tese aqui apresentada teve como objetivo principal averiguar um eventual papel funcional de fibras aferentes do tipo C sensíveis à capsaicina nos mecanismos imunológicos de resistência e suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* em camundongos das linhagens isogênicas Balb/c e C57BL/6, suscetível e resistente à infecção pela cepa Colombiana, respectivamente, bem como o comportamento da doença nestes animais durante a fase aguda da infecção. Para isso, hospedeiros isogênicos geneticamente resistentes à infecção (C57BL/6), hospedeiros suscetíveis à infecção (Balb/c), e também hospedeiros suscetíveis à infecção, porém, com desnervação das fibras sensoriais por tratamento com capsaicina (Balb/c desnervados) foram inoculados com formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, 7 dias após o último dia tratamento dos animais com capsaicina ou veículo. No decorrer e após 21 dias de infecção, curva de parasitemia, eletrocardiograma, ecocardiograma, histopatologia e análise do perfil fenotípico de subgrupos de células T auxiliares (TCD4⁺) presentes no baço, bem como o nível de citocinas séricas foram estudados. Os grupos de animais foram pareados por idade, fundo genético e tratamento, sendo os grupos de animais não infectados utilizados como controle negativo (C57BL/6, Balb/c não desnervados e Balb/c desnervados). Os animais do

grupo C57BL/6 infectado, quando comparado com animais dos grupos Balb/c infectados não desnervados e Balb/c infectados desnervados, apresentaram parâmetros parasitológicos, eletro- e ecocardiográficos, histopatológicos e imunológicos condizentes com o perfil genético de resistência do hospedeiro, ou seja, uma significativa atenuação da miocardite e número reduzidos de protozoários no coração e no sangue. Em adição, curiosamente, pode-se observar que os animais Balb/c infectados desnervados apresentaram uma significativa diminuição tanto do infiltrado inflamatório miocárdico quanto dos níveis quantitativos de parasitos na circulação e no tecido cardíaco, associado a uma significativa melhora funcional dos parâmetros eletro- e ecocardiográficos em comparação com animais do grupo Balb/c infectado não desnervado. Uma potencialização do padrão de resposta imune do tipo Th1 nos animais chagásicos desnervados, evidenciada por um aumento significativo na frequência de células do subgrupo Th1 em comparação com o grupo Balb/c chagásico não desnervado, oferece uma explicação para os resultados supracitados. Em conjunto, os resultados experimentais apresentados nesta tese sugerem que fibras sensoriais primárias sensíveis à capsaicina são capazes de diminuir parcialmente padrões de respostas imune do tipo Th1 durante a fase aguda da infecção experimental pela cepa Colombiana do *T. cruzi* em camundongos da linhagem Balb/c, promovendo uma maior suscetibilidade do hospedeiro à doença. O eventual envolvimento de circuitos sensoriais centrais intimamente relacionados com a via aferente estudada, e os mecanismos neurofisiológicos pelos quais a construção perceptiva da doença leva à diminuição da frequência de células dos subgrupos Th1, provocando, conseqüentemente, um aumento da suscetibilidade do hospedeiro da linhagem Balb/c à infecção, precisam ser averiguados.

Palavras chave: neuroimunomodulação, doença de Chagas, resistência, suscetibilidade.

ABSTRACT

Disease outcomes during the course of parasitic infections is critically influenced by the bidirectional interactions between the protective host immune response to parasites and the parasitic strategies to escape the immune response. Clinical and experimental data published over the past decades provide strong evidence that the nervous, central and peripheral, system exerts profound influence over the organization of immune behavior in a wide variety of immunogenic contexts, such as infectious diseases, cancer, transplantation, autoimmunity and so on. Experimental data gathered from our group indicate that the autonomic nervous system, both sympathetic and parasympathetic divisions, is a key player involved in the host-*T.cruzi* interaction and in the Chagas' disease progression. The activation of both these divisions of autonomic nervous systems is mainly reflex including the participation of afferent nerves relaying to central nervous system nuclei and then to autonomic neurons. The potential role of afferent nerves, in particular the capsaicin-sensitive type C afferent nerves, in modulating autonomic nerves and hence in the pathogenesis and pathophysiology during the acute phase of Chagas disease has not yet been investigated, to our knowledge. Therefore, central aim of this thesis is to investigate the potential role played by capsaicin-sensitive type C afferent fibers in the pathophysiology of Chagas disease in mice infected with *Trypanosoma cruzi*, during the acute phase of infection. For this, hosts susceptible to infection (Balb / c), and also hosts susceptible to infection, but with denervation of sensory fibers by capsaicin treatment (denervated Balb/c) were inoculated with trypomastigote forms of the Colombian strain of *T. cruzi*, 7 days after the last day treatment of animals with capsaicin or vehicle. For the sake of comparison to resistant strain, isogenic hosts genetically resistant to infection (C57BL/6) were also inoculated. In the course and after 21 days of infection (acute phase), parasitemia, electrocardiogram, echocardiogram, histopathology and analysis of the phenotypic profile of subgroups of helper T cells (TCD4 +) present in the spleen, as well as the level of serum cytokines were studied. The groups of animals were matched by age, genetic background and treatment, and the groups of uninfected animals were used as negative control (C57BL/6, non-denervated Balb/c and denervated Balb/c). The animals of the infected group C57BL/6, when compared with non-denervated infected Balb/c and denervated infected Balb/c groups, presented parasitological, electro- and echocardiographic, histopathological and immunological parameters consistent with the

genetic resistance profile of the host, that is, a significant lower myocarditis and reduced blood and cardiac tissue parasitism. In addition, interestingly, it can be observed that the denervated infected Balb/c animals showed a significant decrease in both myocardial inflammatory infiltration and in the quantitative levels of parasites into the blood and into the cardiac tissue, associated with a significant functional improvement of the electro- and echocardiographic parameters compared to non-denervated infected Balb/c group. A potentiation of the Th1-type immune response pattern in denervated chagasic animals, evidenced by a significant increase in the splenic Th1 cell population compared to the non-denervated Chagasic Balb/c group, provides an explanation for the above results. Taken together, the experimental results presented in this thesis suggest that capsaicin-sensitive type C afferent fibers are responsible, at least in part, for inhibiting the generation of Th-1 cells and, consequently, confers greater susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection in Balb/c mice. Which possible central circuits and neural pathways are involved with the decrease in the Th1 cell population, then provoking a higher susceptibility of the Balb/c lineage to infection, remain to be addressed

Key words: neuroimmunomodulation, Chagas disease, resistance, susceptibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Patogênese da doença de Chagas cardíaca	28	
Figura 2	Anatomia dos neurônios sensoriais com função na interação neuro-imune	34	
Figura 3	O reflexo inflamatório	38	28
Figura 4	Desenho experimental	51	
Figura 5	Protocolo Experimental do procedimento de denervação sensorial de fibras C sensíveis à capsaicina.....	53	
Figura 6	Curva de parasitemia ao longo de 21 dias de seguimento dos animais dos grupos Balb/c chagásico controle e desnervado e do grupo C57BL/6 infectado	63	
Figura 7	Área sob a curva de parasitemia ao longo de 21 dias de seguimento (expressa como mediana e percentis de 5, 10, 25, 75, 90 e 95%) dos animais dos grupos Balb/c chagásico não desnervado e desnervado e do grupo C57BL/6 chagásico	64	
Figura 8	Imagens ecocardiográficas em modo bi-dimensional (painéis superiores) e em modo M (painéis inferiores) representativas de um animal Balb/c não infectado controle (A) e de um animal Balb/c não infectado desnervado (B)	70	
Figura 9	Imagens ecocardiográficas em modo bi-dimensional (painéis superiores) e em modo M (painéis inferiores) representativas de um animal Balb/c infectado controle (A) e de um animal Balb/c infectado desnervado (B)	71	
Figura 10	Fotomicrografias de luz de tecidos atriais (painéis A, B e C), ventriculares direitos (painéis D, E e F) e ventriculares esquerdos (G, H e I) de animais representativos dos grupos Balb/c não infectado não desnervado (painéis A, D e G), Balb/c não infectados desnervado (painéis B, E e H) e C57BL/6 não infectado (painéis C, F e I)	74	

Figura 11	Fotomicrografias de luz de tecidos atriais (painéis A, B e C), ventriculares direitos (painéis D, E e F) e ventriculares esquerdos (painéis G, H e I) de animais representativos dos grupos Balb/c infectado não desnervado (painéis A, D e G), Balb/c infectados desnervado (painéis B, E e H) e C57BL/6 infectado (painéis C, F e I)	75
Figura 12	Fotomicrografias de luz de tecidos ventriculares de Balb/c infectado não desnervado (painel A), Balb/c infectado desnervado (painel B) e C57BL/6 infectado (painel C), mostrando os ninhos de amastigotas (setas)	76
Figura 13	Citometria de fluxo de células mononucleares Th1 (CD4+IFN γ +) do baço.....	78
Figura 14	Citometria de fluxo de células mononucleares T reguladoras (CD4+Foxp3+) do baço.....	79
Figura 15	Citometria de fluxo de células mononucleares Th2 (CD4+IL-13+) do baço.....	80
Figura 16	Citometria de fluxo de células mononucleares Th17 (CD4+IL-17+) do baço	81
Figura 17	Níveis séricos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e da quimiocina MCP-1 nos grupos experimentais Balb/c e C57BL/6 não infectados e infectados e não desnervados e desnervados	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de parâmetros eletrocardiográficos (expressos como média e desvio padrão) de animais não infectados e infectados dos grupos C57BL6/j, Balb/c e Balb/c desnervado	67
Tabela 2	Valores de parâmetros ecocardiográficos (expressos como média e desvio padrão) de animais não infectados e infectados dos grupos C57BL6/j, Balb/c e Balb/c desnervado	69
Tabela 3	Valores de “score “inflamatório expressos como mediana (intervalo interquartil) de átrio, ventrículo direito e ventrículo esquerdo de animais não infectados e infectados dos grupos C57BL6/j, Balb/c e Balb/c desnervado	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	acetilcolina
Ac	anticorpo
Ag	antígeno
AP-1	ativador de proteína 1
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Células Th	células T auxiliar (helper)
Células Th0	célula T auxiliar 0
Células Th1	célula T auxiliar 1
Células Th2	célula T auxiliar 2
Células NK	células natural killer
Células Treg	células T reguladoras
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DC	débito cardíaco
DIAE	diâmetro interno do átrio esquerdo
DIVD	diâmetro interno do ventrículo direito.
DIVE	diâmetro interno do ventrículo esquerdo
DMN	núcleo motor dorsal do vago
DP	desvio padrão
Dp	duração da onda P
dQRS	duração do intervalo QRS
DTUs	“discrete timing units”
ECG	eletrocardiograma
ECO	ecocardiograma
FC	frequência cardíaca
Hz	hertz
ip	intraperitoneal
iPR	intervalo PR
iQT	intervalo QT
iQTc	intervalo QT corrigido
iRR	intervalo RR
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-4	interleucina 4

IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-17	interleucina 17
IL-21	interleucina 21
IL-22	interleucina 22
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
KO β 2-CHG	animais knockout para o receptor β 2 chagásicos.
KO β 2-CON	animais knockout para o receptor β 2 sem infecção
KOVACHT	animais“knockout” para o gene da proteína transportadora vesicular da acetilcolina
KOVACHT-CHG	animais“knockout” para o gene da proteína transportadora vesicular da acetilcolina chagásicos
KOVACHT-CON	animais“knockout” para o gene da proteína transportadora vesicular da acetilcolina sem infecção
LPS	lipolissacarídeo
MHz	megahertz
mg/Kg	miligramas/quilogramas
mg/mL	miligrama/mililitro
MCP-1	proteína quimioatrativa de monócito-1
MMP	metaloproteinases
NA	noradrenalina
NF-kB	factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NTS	núcleo do trato solitário
NT-CHG	animais chagásicos não tratados
PIR-CHG	animais chagásicos tratados com brometo de piridostigmina
PBS	tampão fosfato de sódio
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Chain Reaction Polimerase</i>)
PMA	“phorbol miristrate acetate”

SAL-CHG	animais tratados com salbutamol
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SIV	espessura do septo interventricular
SNP	sistema nervoso periférico
SP	substância P
<i>T.cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TGF- β	fator transformador do crescimento-beta
TNF- α	fator de necrose tumoral- alfa
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
VVA	velocidade vertical do fluxo de contração atrial (A) do VE
VVE	velocidade vertical do fluxo de enchimento rápido (E) do VE
μ L	microlitro
WT-CONT	animais selvagens sem infecção
WT-CHG	animais selvagens com infecção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	ASPECTOS GERAIS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS	24
1.1.1.	Resposta Imune à Doença de Chagas	28
1.1.2.	Sistema Nervoso Autônomo na Doença de Chagas	31
1.2	CONTROLE AUTONÔMICO DO SISTEMA IMUNE.....	32
1.2.1.	Neuroimunomodulação sensorial.....	33
1.2.2.	Neuroimunomodulação simpática.....	36
1.2.3.	Neuroimunomodulação Parassimpática Vagal.....	37
1.2.4.	Reflexo inflamatório	38
1.3.	NEUROIMUNOMODULAÇÃO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA	40
2.	JUSTIFICATIVA.....	45
3.	OBJETIVOS.....	47
3.1.	OBJETIVO GERAL	48
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4.	METODOLOGIA	49
4.1.	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	50
4.2.	GRUPOS EXPERIMENTAIS	50
4.4.	DEAFERENTAÇÃO POR CAPSAICINA	53
4.5.	INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	55
4.5.1.	Característica da Cepa Colombiana do <i>T.cruzi</i>	55
4.6.	PARASITEMIA.....	56
4.7.	ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO CONVENCIONAL.....	56
4.8.	ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO.....	57
4.9.	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	59
4.10.	DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS	59
4.10.1	Citometria de Fluxo (Cytometric Bead Array)	59
4.11.	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL CELULAR ESPLÊNICO	60
4.11.1.	Preparo da suspensão de células provenientes do baço.....	60
4.11.2.	Imunofenotipagem de células do baço	61
4.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5.	RESULTADOS	62

5.1. AVALIAÇÃO DA DESNERVAÇÃO	63
5.2. AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA	63
5.3. AVALIAÇÃO FUNCIONAL CARDÍACA.....	63
5.3.1. Eletrocardiograma	66
5.3.2. Ecocardiograma.....	69
5.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA CARDÍACA.....	73
5.6. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA	78
5.6.1. Fenotipagem de células do baço.....	78
5.6.2. Citocinas e quimiocinas séricas	82
6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÕES.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma antropozoonose inicialmente descrita por Carlos Chagas em 1909. Esta infecção é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1911) e permanece como um dos maiores problemas de saúde pública da América Latina, sendo considerada uma doença tropical negligenciada pela WHO (World Health Organization). É endêmica em 21 países da América desde o sul dos EUA ao norte da Argentina e do Chile, afetando cerca de 6-8 milhões de pessoas e provocando milhares de mortes por ano, em todo mundo. Atualmente ela se espalha pelo norte da América e Europa principalmente por meio do processo de migração (PRATA, 2001; COURA JR. & VIÑAS, 2010; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018; BONNEY et al; CHEVILLARD et al, 2018)

O *T. cruzi* é transmitido principalmente por meio da deposição de fezes do vetor com formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas, sobre os tecidos cutâneos e mucosos do homem, durante o repasto sanguíneo do vetor, um triatomíneo hematófago. Nos anos 90 foram lançadas estratégias de intervenção em larga escala em diferentes regiões da América Latina, reduzindo assim a prevalência dessa via de transmissão vetor-homem, diminuindo em torno de 40% a prevalência da doença (BALOUZ et al, 2017). Outros mecanismos de transmissão, não vetoriais, também foram descritos: 1) de acordo com Balouz e seus colaboradores (2017), a transmissão via oral, por meio da ingestão de alimentos contaminados com as formas tripomastigotas, provavelmente constitui um traço epidemiológico antigo, muito importante para a disseminação zoonótica do parasita e parece estar associado ao aumento da virulência e à maior taxa de letalidade em humanos; 2) a transmissão transplacentária (congênita) constitui um importante modo de transmissão do *T. cruzi* em áreas não endêmicas, tendo uma estimativa de 22% das novas infecções anuais em países endêmicos com programas ativos de controle de infestações por vetores domiciliares (BALOUZ et al, 2017); 3) a transmissão transfusional, por transplante de órgãos e medula é possível e têm se tornado um problema até em áreas não endêmicas. Segundo Perez-Molina & Molina (2018), na América Latina e em regiões não endêmicas, como EUA, Canadá e muitas partes da Europa, alguns casos de infecção mediada por transfusão e transplante foram documentados, podendo o número real de casos ser substancialmente maior devido ao grande número de casos não identificados. Sabe-se que a transmissão por transfusão de

sangue depende de vários fatores, como a concentração de parasitos no sangue do doador, o componente sanguíneo transfundido e a cepa do parasito. Além disso, os processos de migração de populações infectadas pelo *T. cruzi*, de áreas rurais para centros urbanos ou para regiões não endêmicas, juntamente com mudanças na distribuição ecogeográfica de populações de vetores, levaram à urbanização e globalização gradual da doença de Chagas (VINHAES & DIAS, 2000; COURA, 2003; RASSI JR et al, 2010; BALOUZ et al, 2017; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018).

Após a infecção, o parasito passa por ciclos de invasão, divisão e lise celular por várias semanas. Sucedendo um período de incubação, inicia-se a fase aguda, onde os parasitos podem ser detectados no sangue, embora a maioria dos indivíduos infectados seja assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos (BONNEY & ENGMAN, 2015).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, possuindo vários estágios de desenvolvimento conhecidos como amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. Nos seres humanos, hospedeiros vertebrados, o *T. cruzi* assume duas formas, a forma tripomastigota, caracterizada por ser a forma infectante, não se dividir e apresentar um flagelo que se estende ao longo da borda externa de uma membrana ondulante; e a forma amastigota, que não possui flagelo e que se multiplica dentro de vários tipos de células (SOUZA, 2014; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2018). A interação entre o *T. cruzi* e a células do hospedeiro, envolve processos complexos que estão intimamente relacionados com cepa e a forma infectante do parasito, além de vários tipos de células alvos do hospedeiro, como os macrófagos, células epiteliais, endoteliais, dentríticas, fibroblastos, neurais, cardiomiócitos e ainda linfócitos. Assim, a invasão das células pelo *T. cruzi* acontece através de uma interação entre proteínas ou fatores ligantes do parasito e receptores na superfície celular do hospedeiro definitivo, o que leva a uma ativação de várias vias de sinalização celular. Após a invasão, as formas tripomastigotas livres no citoplasma celular diferenciam-se em formas amastigotas, que sofrem divisões binárias e transformam-se novamente em formas tripomastigotas. O movimento da grande quantidade de parasitos e a secreção de substâncias leva a um desequilíbrio na estrutura da membrana celular do hospedeiro, e assim rompe a célula liberando os parasitas (tripomastigotas) para a corrente sanguínea e células vizinhas, onde ativamente migram para outras células, iniciando um novo ciclo, ou são destruídas pelo sistema imune (ALVES & MORTARA, 2009; SOUZA, 2014).

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases clínicas distintas: aguda e crônica. A fase aguda se inicia após um período de incubação que varia entre 7 e 10 dias, durando cerca de 4 a 8 semanas, em geral assintomática, com elevado parasitismo sanguíneo e tecidual. Os casos sintomáticos podem apresentar sinais de porta de entrada como chagoma de inoculação ou sinal de Romanã, além de sinais inespecíficos. De acordo com Bonney (2018) aproximadamente 1% dos indivíduos infectados agudamente, apresentam linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, efusão pericárdica, insuficiência cardíaca ou meningoencefalite. Essa fase é acompanhada por uma excessiva ativação do sistema imune com uma resposta adquirida eficaz, levando ao controle da parasitemia e parasitismo (PRATA, 2001; COURA & BORGES-PEREIRA, 2010; JUNQUEIRA et al, 2010; ROGGERO et al, 2018; BONNEY et al, 2018).

Após um período de latência que dura de 2 a 4 meses, a fase crônica se inicia podendo ser assintomática (indeterminada) ou se apresentar como formas clínicas crônicas, como a digestiva, a cardíaca ou uma forma mista cardiodigestiva (PRATA, 2001). A forma clínica crônica mais prevalente é a indeterminada, afetando cerca de 60 – 70% das pacientes de áreas endêmicas. A maioria das pessoas infectadas permanece nessa forma por toda a vida, com a ausência sinais e sintomas clínicos, embora a sorologia específica seja sempre positiva. Aproximadamente 30-40% dos indivíduos infectados eventualmente progridem da fase indeterminada para a fase crônica da doença de Chagas (PRATA, 2001; BONNEY et al, 2018).

A forma digestiva é a forma crônica menos comum e está presente em 8-10% dos casos, sendo os sintomas na maioria das vezes o resultado de danos provocados pelo *T. cruzi* na inervação autonômica mioentérica. As manifestações mais comuns estão associadas ao alargamento de esôfago e intestino, com sintomas que variam de distúrbios de motilidade assintomática a acalasia leve a megaesôfago grave, e o megacolon, que é caracterizado por constipação persistente e pode levar a fecaloma, volvos e isquemia intestinal (PRATA, 2001; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2017; BONNEY et al, 2018).

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é a mais importante das manifestações clínicas crônicas da doença de Chagas, devido a frequência com a qual se desenvolve, sua gravidade, morbidade e mortalidade, a qual afeta cerca de 20-30% dos indivíduos infectados (BONNEY et al, 2018). Esta forma clínica é complexa com amplo espectro de manifestações, desde um envolvimento mínimo do miocárdio até

uma disfunção sistólica ventricular esquerda, cardiomiopatia dilatada, arritmias, eventos tromboembólicos e insuficiência cardíaca terminal, afetando principalmente o sistema de condução elétrica e miocárdio, podendo até levar à morte.

Achados histopatológicos cardíacos na fase crônica incluem infiltrado inflamatório mononuclear, miocardite focal, epicardite e neuroganglionite, associados a focos fibróticos variáveis (PRATA, 2001; MARIN-NETO et al., 2007; PÉREZ-MOLINA & MOLINA, 2017; BONNEY et al, 2018). A escassez de parasitos no tecido do miocárdio correlacionada à infiltração inflamatória está associada a várias teorias que buscam explicar a patogenia da doença: 1- a teoria da privação parassimpática, baseada no desequilíbrio autonômico cardíaco, devido à denervação parassimpática cardíaca (KOBBERLE, 1968); 2- teoria autoimune, na qual o mimetismo molecular entre antígenos parasitários e tecido miocárdico induz uma resposta autoimune contra fibras miocárdicas (SANTOS-BUCH & TEIXEIRA, 1988) e 3- teoria microvascular, na qual alterações microvasculares induzidas pelo parasita a partir de processos trombóticos e/ou isquêmicos exercem um papel significativo na gênese da CCC (ROSSI, 1990). Entretanto, o desenvolvimento de técnicas imuno-histoquímicas e de biologia molecular permitiram a observação de antígenos e DNA parasitários em focos inflamatórios no coração, reforçando um papel ativo exercido pelo parasito na gênese da CCC (MARIN-NETO et al., 2007).

A despeito da complexa patogenia, o pensamento atual é que a inflamação no coração se desenvolve ao longo dos anos a partir de processo lento e de baixo grau que depende, pelo menos em parte, dos poucos parasitas que persistem no coração. Existem mecanismos celulares e moleculares entrelaçados que contribuem para respostas degenerativas, destrutivas, inflamatórias e reparadoras no miocárdio. O conjunto desses processos resulta nos danos cardíaco e remodelação que levam à insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas, fenômenos trombo-embólicos e morte súbita (BONNEY et al, 2018).

No coração, o *T. cruzi* pode infectar miócitos, células endoteliais, neurônios, fibroblasto e adipócitos, mostrando tropismo específico por fibras estriadas cardíacas. Esse tropismo não foi ainda completamente entendido, mas pode estar relacionado aos mecanismos de reparo da membrana plasmática altamente desenvolvidos que operam nessas células, o que facilita a entrada do parasito. O grau da miocardite depende da cepa de *T. cruzi* e de características genéticas e imunológicas do hospedeiro. Na dependência destes fatores, a replicação intracardíaca fulminante, ou seja, a reativação

pode ocorrer, levando o acúmulo de grandes quantidades de formas amastigotas intracelulares. As fibras miocárdicas infectadas pelo *T. cruzi* mostram danos, caracterizados por vacuolização, miocitólise e degeneração miofibrilar, associados à intensa infiltração de células mononucleares, inicialmente composta de macrófagos e neutrófilos e, em seguida, há a adição de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos. A infiltração de linfócitos apresenta ampla especificidade antigênica, incluindo antígenos dos parasitos, hospedeiros e inespecíficos. Outros fatores também contribuem para a exacerbação da resposta inflamatória, incluindo a produção local de citocinas, quimiocinas e seus receptores, a “upregulation” de moléculas de adesão, ativação do complemento, agregação e adesão plaquetária, e produção de anticorpos e opsonização. Assim, a resposta imune adaptativa do indivíduo se desenvolve diminuindo o número de parasitas e células inflamatórias, porém permanecendo anormalidades residuais decorrentes da miocardite, como a fibrose intersticial e hipertrofia das fibras, com uma reação inflamatória contínua de baixo grau. A cardiomiopatia chagásica pode ter variações desde alterações mínimas até dilatação dos átrios e ventrículos, em casos graves (BONNEY, 2018).

Muitos dos mecanismos propostos para a patogênese da cardiomiopatia chagásica envolvem a presença do parasito relacionado com uma integração de vários processos, já que *T. cruzi* replica e persiste em seu hospedeiro humano até que ele possa ser transmitido para outro hospedeiro. Entre esses mecanismos estão inflamação, produção de autoanticorpos, disautonomia, hipertrofia, destruição dos miócitos, microvasculopatia, arritmias e formação de aneurisma apical (Figura 1) (BONNEY, 2018).

1.1.1. Resposta Imune à Doença de Chagas

A resistência imune contra patógenos intracelulares tem sido atribuída a um padrão de resposta imune celular de células T auxiliares 1 (Th1), enquanto resposta imune celular Th2 estaria associada a susceptibilidade à doença (ROMAGNANI, 1996; GROOM et al, 2017).

Durante a fase aguda da doença de Chagas, há uma síntese sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e ativação de componentes da resposta imune inata, como as células natural killer (NK), macrófagos, mecanismos envolvendo receptores “Toll-like” e receptores Nod-likes e inflamassomos, em conjunto com a ativação policlonal de células

T. Essa ativação recente do sistema imune inato esta aparentemente envolvida com a resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*. A estimulação de IL-12 e síntese de TNF α pelos macrófagos e células dendríticas, irão ativar as células NK para produzir IFN γ , que influencia o desenvolvimento de linfócitos T auxiliares com fenótipo Th1. Já IFN γ e TNF α ativam macrófagos que produzem óxido nítrico (NO), sendo o responsável primário para controle da replicação do parasito. (GOLGHER & GAZZINELLI, 2004; BONNEY, 2018)

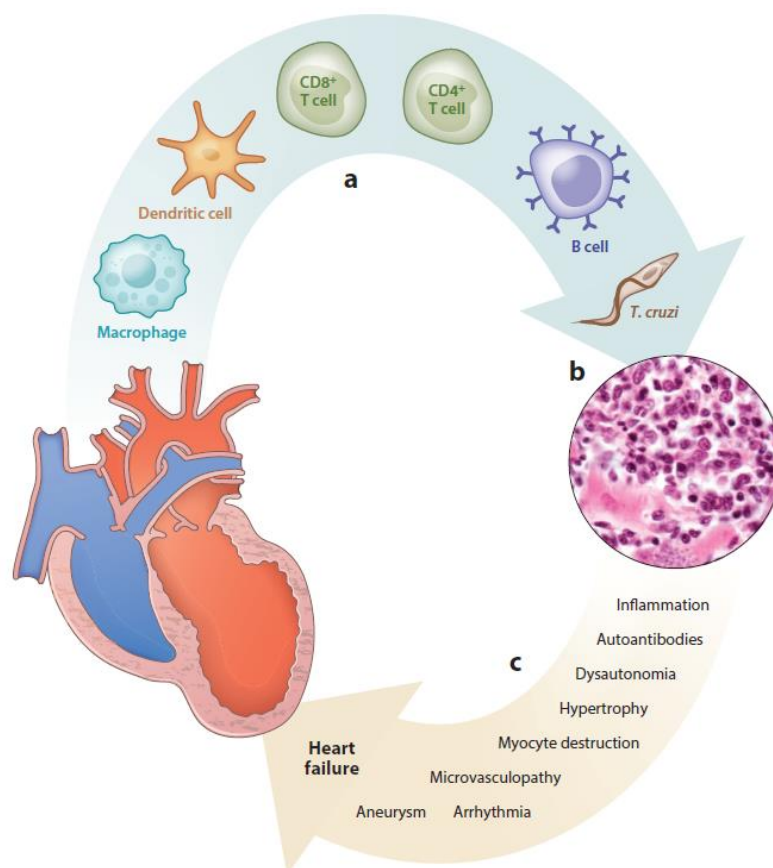


Figura 1: Patogênese da doença de Chagas cardíaca. (a) Variedade células, incluindo *T. cruzi*, infiltrado inflamatório (b) histopatologia caracterizada pelo infiltrado de células mononucleares, edema, destruição de miócitos, e fibrose. Parasitas não são tipicamente observados em infecção crônica. (c) Mecanismos que podem levar a progressão da disfunção cardíaca na insuficiência cardíaca na infecção pelo *T. cruzi*. BONNEY K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 421-447, 2018.

Na doença de Chagas, a resposta imune celular e possivelmente humoral tem sido relatada como um eventual controle na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, sugerindo um estado de supressão de células T juntamente com uma forte estimulação de células B policlonais, que restringe a expansão de linfócitos específicos de antígeno.

Após as primeiras replicações no tecido do hospedeiro, os parasitos são fagocitados e processados pelos macrófagos e células apresentadoras de antígenos. As interações entre os sistemas imunes inato e adaptativo conduzem a uma apresentação funcional de antígenos de *T. cruzi*, iniciando uma resposta imune específica ao parasito. O padrão específico de citocinas Th1 ou Th2 presente neste momento determinará a resistência ou suscetibilidade do hospedeiro à infecção parasitária, respectivamente. Portanto, citocinas Th1 pró-inflamatórias, tais como IFN γ , TNF α , IL-12 e óxido nítrico, exercem um importante papel na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. A IL-12 induz a conversão de Th0 para Th1. Células Th1 induzem a produção de IFN γ em células NK, T CD4⁺ e CD8⁺, o que estimula as células efetoras, tais como linfócitos B e T CD8⁺ a produzir anticorpos e citotoxicidade efetiva, respectivamente, objetivando destruir as células infectadas com *T. cruzi*. Em contraste, citocinas anti-inflamatórias, tais como TGF β e/ou IL-10, quando apresentadas no momento de reconhecimento e ativação de células apresentadoras de antígenos, inibem a ação tripanomicida de macrófagos ativadas por IFN γ (JUNQUEIRA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011; ROGGERO et al, 2018). Assim, células Th1 específicas contra antígenos de *T. cruzi*, determinam os níveis reduzidos de parasitos no sangue e tecidos após a infecção pelo *T. cruzi*. A produção de citocinas pró-inflamatórias e a consequente alteração para o perfil de resposta imune Th1 permite, por um lado, um melhor controle dos níveis parasitários sanguíneos e teciduais, mas por outro lado pode induzir uma excessiva resposta inflamatória que poderia atacar cardiomiócitos funcionais, induzindo necrose tecidual e apoptose, devido à grande liberação de quimiocinas e consequente quimioatração de células inflamatórias para o tecido infectado (JUNQUEIRA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011).

A despeito da intensa ativação do padrão de resposta imune Th1, o parasito não é eliminado completamente, sendo capaz de persistir cronicamente no tecido. Não existe dúvida que a cardiomiopatia chagásica (CC) é resultante desse processo inflamatório, sendo essa infiltração uma resposta ao tropismo cardíaco do parasito ou consequências de uma tolerância imunológica alterada (GUTIERREZ et al, 2009).

Um eventual papel exercido pela resposta imune Th17 e por células T reguladoras na patogênese da cardiomiopatia chagásica tem sido investigada com resultados controversos (COBB et al., 2010; DE ARAÚJO et al., 2011). As células Th 17 são produtoras de IL-17, IL-21, IL-22 e TNF α . A IL-17 e as células T reguladoras

parecem ter papel de controle da miocardite e resistência ao *T.cruzi* na fase aguda da doença (GUTIERREZ et al, 2009; CUNHA-NETO & CHEVILLARD, 2014).

Já na fase crônica da doença de Chagas cardíaca, acredita-se que persistência do parasita é um fator para o curso da doença, pois se a resposta imune é ineficiente, a carga do parasita e o aumento da resposta inflamatória levam ao dano tecidual. Mas se a resposta imune é eficiente, a carga do parasita e as consequências inflamatórias diminuídas, levam a um dano tecidual reduzido. Porém não se sabe se o dano tecidual é causado pela presença do parasita ou indiretamente pela imunopatologia em resposta ao mesmo, ou ainda pelos mecanismos autoimunes desenvolvidos (RASSI et al, 2010). Sabe-se que as citocinas Th1/pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF α , IL-12) são produzidas em altos níveis ao longo da fase crônica, provavelmente em função da persistência do parasito no miocárdio e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4). Sendo assim, há um estímulo ativando as células NK a produzirem IFN- γ , e também aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ à produção de TNF- α . O aumento nos níveis de IFN- γ e TNF- α culminam na síntese de iNOS que catalisa a produção de NO pelos macrófagos, tendo uma resposta protetora ao *T.cruzi*, uma vez que o NO inibe a replicação do mesmo. (GUTIERREZ et al, 2009; CUNHA-NETO & CHEVILLARD, 2014). Existe também ativação de leucócitos que levam a um aumento na síntese de IFN- γ , TNF α , IL-12, NO, MMP (metaloproteinases importantes na fibrinogênese), e diminuição de IL-10, IL-4 e um predomínio de linfócitos T e B ativados, sendo as células CD8 responsáveis pela resposta imune ao *T.cruzi* devido a sua função citolítica e produção IFN- γ (GUTIERREZ et al, 2009; RASSI JR et al, 2010). Acredita-se que as células T reguladoras têm função no controle da intensidade da inflamação nessa fase (CUNHA-NETO & CHEVILLARD, 2014).

1.1.2. Sistema Nervoso Autônomo na Doença de Chagas

O sistema nervoso autônomo intracardíaco apresenta ganglionites, periganglionites, neurites e perineurites durante a infecção crônica, com redução acentuada na densidade ganglionar e despovoamento neural. Como consequência, uma importante disfunção autonômica cardíaca, afetando principalmente o braço parassimpático do sistema nervoso autônomo, tem sido descrita em modelos experimentais e em pacientes com CCC (PRATA, 2001; MARIN-NETO et al., 2007). Esta disfunção/denervação autonômica poderia estar implicada na gênese de distúrbios

elétricos graves encontrados em corações chagásicos, o que poderia causar arritmias cardíacas que ameacem a vida e morte súbita (PRATA, 2001; MARIN-NETO et al., 2007). Foi demonstrado que em hamsters chagásicos, há uma forte correlação positiva entre a intensidade da miocardite e o nível de disfunção autonômica cardíaca, sugerindo uma relação causal entre processo inflamatório e disfunção autonômica vagal cardíaca (DIAS DA SILVA et al, 2003). Ramirez (1993) mostrou em registros no mesmo modelo experimental de hamster chagásico, uma importante redução numérica de neurônios pós-ganglionares vagais cardíacos na fase crônica da infecção. Isso reforça a ideia de que a denervação autonômica é uma consequência da infiltração inflamatória no tecido cardíaco, principalmente durante a fase aguda. Além disso, autoanticorpos direcionados aos receptores muscarínicos ou beta-adrenérgicos, com ação agonista ou antagonista, têm sido descritos em pacientes chagásicos. Postula-se que estes autoanticorpos poderiam participar, pelo menos parcialmente, na gênese da disfunção autonômica observada em pacientes com cardiomiopatia chagásica (RAMIREZ et al., 1993; DIAS DA SILVA et al, 2003; RIBEIRO et al., 2010).

Por fim, dados do nosso grupo (CUBA, et al; 2014) e de outros (PÉREZ et al., 2011) associam diferentes perfis de disfunção autonômica e moléculas do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, respectivamente, a diferentes níveis de lesões miocárdicas. Esses dados evidenciam uma vez mais a interação direta entre os sistemas nervoso e imune, mediando tanto os distúrbios cardíaco como autonômico. No entanto, não pode ser excluída uma possível influência da disfunção do sistema nervoso autonômico, per se, no perfil de resposta imune encontrada na doença de Chagas.

1.2 CONTROLE AUTONÔMICO DO SISTEMA IMUNE

Os sistemas nervoso e imune são tradicionalmente considerados regulatórios e integrativos, possuindo cada um estruturas e funções diferentes. Entretanto, eles podem funcionar de maneira integrada e coordenada na defesa do hospedeiro, garantindo a homeostase. Esses sistemas possuem comunicação bidirecional e adaptativa, embora em alguns casos possam contribuir para a fisiopatologia das doenças, sendo que o fundamento pelo qual esses neurônios e células imunes contribuem para a saúde ou doença ainda permaneça sem esclarecimento adequado.

1.2.1. Neuroimunomodulação sensorial

Os neurônios sensitivos detectores de estímulos nocivos provocam a dor (nociceptores), e as células do sistema imunológico detectam diretamente a presença de patógenos. Essas células podem tornar os nociceptores mais sensíveis, que por sua vez, alteram localmente a função imunológica, e os neurônios autonômicos sistemicamente suprimem a inflamação (TALBOLTE et al., 2016; FOSTER et al., 2017).

O sistema nervoso possui uma organização anatômica fixa, sendo dividido em Sistema Nervoso Central (SNC), o qual consiste da medula espinhal e encéfalo; e Sistema Nervoso Periférico (SNP), o qual consiste de fibras nervosas que carregam as informações periféricas para o SNC e vice-versa. As fibras nervosas que levam os sinais periféricos para o SNC são chamadas de neurônios sensoriais ou aferentes e as fibras que transmitem os sinais da parte central para a periferia, são chamadas de neurônios eferentes ou motores. Os neurônios sensoriais são classificados como espinhais quando possui corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal e projetam para a medula espinhal, e cranianos, como o nervo vago, por exemplo, quando possuem corpos celulares nos gânglios sensoriais dos nervos cranianos e projetam para o tronco encefálico e cérebro (Figura 2). Esses neurônios são ativados por estímulos sensoriais periféricos, tais como, tato, pressão, temperatura, substâncias químicas, etc. Estes mesmos neurônios sensoriais podem sofrer ativação imune celular com liberação de citocinas e moléculas de sinalização. A maior classe de neurônios sensoriais são os nociceptores que incluem dois tipos de neurônios, os quais ainda podem ser subdivididos de acordo com o perfil de expressão molecular de seus receptores, canais de íons, e liberação de neuropeptídeos específicos: as fibras A δ e as fibras C. As fibras C não são mielinizadas e a condução do impulso nervoso é lenta, geralmente estão associados à sensibilidade de dor e de temperatura, sendo sensíveis à capsaicina (TALBOLT et al., 2016; CHAVAN et al., 2017).

O SNP pode ser dividido em autônomo involuntário e somático voluntário, o primeiro regula e controla as funções neurovegetativas, dos sistemas respiratório, cardiovascular, renal, digestório e endócrino, garantindo a homeostase. Enquanto o segundo gera ações motoras músculo-esqueléticas. Ambos os sistemas podem interagir alterando a resposta imune, especialmente em regiões do corpo suscetíveis à invasão microbiana, como a pele e as superfícies mucosas das vias aéreas e do trato

gastrointestinal, que são densamente innervadas pelos nociceptores (TALBOLT et al., 2016).

A proximidade dos terminais axônicos das fibras sensoriais às células imunes e a expressão de receptores para citocinas, fatores de crescimento e outros acabam por facilitar a modulação imune por essas fibras, que juntamente com as células imunes podem detectar patógenos e produtos de inflamação (hipóxia, produtos liberados de morte celular, neuropeptídios e citocinas inflamatórias) através de receptores que são compartilhados entre os dois sistemas em questão. As citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17A, mediadores inflamatórios como serotonina (5HT), histamina, prostaglandinas, fator de crescimento do nervo e patógenos podem ativar diretamente esses neurônios sensoriais, que além de ter uma função na sensação de dor, possui papel importante como reguladores da função das células imunes e inflamação. Após essas terminações nervosas periféricas serem ativadas há a liberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e substância P (SP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e outros neuropeptídios, que via seus receptores nas células imunes e vasculatura promovem ou suprimem a inflamação, via reflexo axônio-axônio (TALBOLT et al., 2016; CHAVAN & TRACEY, 2017; CHAVAN et al, 2017).

O sistema imune possui função similar ao sistema nervoso sensorial, o qual funciona como um detector dos constituintes químicos específicos dos microrganismos, sinalizando-os ao sistema nervoso central, levando a coordenação da resposta fisiológica, ligando o ambiente externo à componentes moleculares e celulares internos. Os mecanismos imunes sensoriais estão relacionados à barreira hemato-encefálica e aos nervos sensoriais periféricos, com particular destaque ao nervo vago. Este nervo carrega a maior via sensorial visceral, que devido à sua localização anatômica possui a função imuno-sensorial, tendo seus aferentes distribuindo-se para as estruturas viscerais, incluindo aquelas que mais frequentemente entram em contato com os patógenos (GOEHLER et al, 2000; CHAVAN et al, 2017; REY & BESEDOVSKY, 2017).

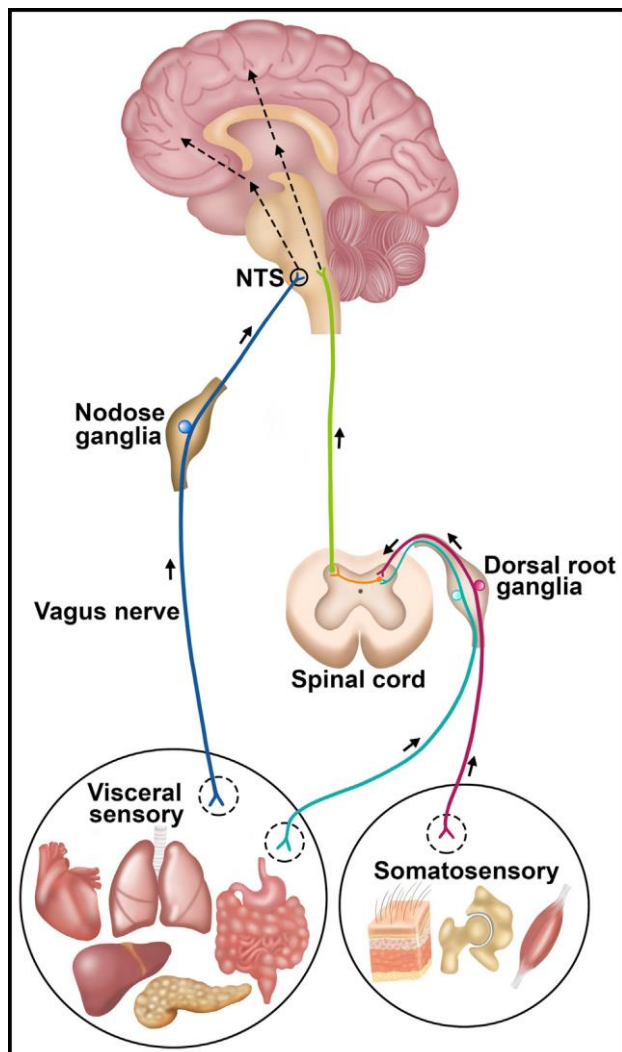


Figura 2: Anatomia dos neurônios sensoriais com função na interação neuro-imune. Os neurônios sensoriais com corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal são somatossensíveis e viscerais. Os neurônios somatossensíveis (inervando a pele, as articulações e os músculos) e os neurônios viscerais (inervando o trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, pulmões, coração e outros órgãos) entram na medula espinhal através do corno dorsal. Na medula espinhal, os terminais axônicos centrais desses neurônios fazem interações sinápticas com interneurônios e neurônios relé transmitindo os sinais para o tronco cerebral e outras áreas desse. Os neurônios sensoriais do vago são originados nos gânglios nodosos (anatomicamente divididos em gânglios nodoso e jugular em ratos e seres humanos) e inervam órgãos viscerais, incluindo o trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, pulmão, coração e outros órgãos. A maioria dos axônios centrais termina no núcleo do trato solitário (NTS) e projeta-se para outras áreas do tronco encefálico e do prosencéfalo. A atividade dos neurônios somatossensíveis e viscerais na transmissão da informação periférica para o SNC, é alterada em doenças inflamatórias e condições auto-imunes que afetam as áreas inervadas dos órgãos viscerais e somáticos. Fonte: CHAVAN, S S.; PAVLOV, V A.; TRACEY, K J.. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity*, v. 46, n. 6, p. 927-942, jun. 2017.

1.2.2. Neuroimunomodulação simpática

As fibras nervosas simpáticas, originárias dos segmentos torácicos e lombares da medula espinhal dão projeções pré-ganglionares aos gânglios paravertebrais ou prevertebrais. A interação entre neurônios pré-ganglionares e pós-ganglionares se dá através da acetilcolina (ACh). Já as fibras pós-ganglionares simpáticas liberam predominantemente noraepinefrina e em menor quantidade outras catecolaminas e neuropeptídeo Y nos órgãos viscerais. As fibras pré-ganglionares simpáticas também inervam a medula adrenal e estimula a secreção de epinefrina e em menor quantidade outras catecolaminas, como naraepinefrina e dopamina pelas células cromafins. Há efeitos fisiológicos pela atuação dessas moléculas como reguladores das funções gastrointestinal, cardiovascular e pulmonar, além de atuar nos processos metabólicos (CHAVAN et al, 2017).

O sistema nervoso simpático parece ter relevância central para a imunoregulação, já que os nervos simpáticos respondem às alterações com a liberação de noradrenalina (NA), principalmente na inflamação aguda, sendo seus efeitos anti- ou pró-inflamatórios mediados pelos receptores adrenérgicos, dependendo do contexto, do tipo de receptor e célula imune envolvidos. Através dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos, a epinefrina e naraepinefrina inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulam a de anti-inflamatória. Já a noraepinefrina atuando em receptores $\alpha 2$ adrenérgicos em monócitos e macrófagos leva a síntese de TNF- α e outros mediadores pró-inflamatórios (CHAVAN et al, 2017; REY & BESEDOVSKY, 2017).

As interleucinas IL-1, IL-6 e TNF α são importantes citocinas pró-inflamatórias e estimulam a produção de glicocorticoides por meio da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BESEDOVSKY et al., 1986). Paralelamente à ativação deste eixo neuro-humoral, ocorre também a ativação da via central locus ceruleus – sistema nervoso simpático, que induz a liberação de catecolaminas nos tecidos periféricos, incluindo órgãos linfóides (ELENKOV & CHROUSOS, 1999). Os órgãos linfóides, como baço, timo, linfonodos, medula óssea e tecidos linfóides mucosos, semelhante aos vasos sanguíneos, recebem predominantemente inervação simpática noradrenérgica/peptidérgica Y (ELENKOV & CHROUSOS, 1999). Praticamente todas as células linfóides expressam receptores adrenérgicos, principalmente receptores beta2, com exceção das células T auxiliares 2 (Th2) (SANDERS, 1998). Estes dados representam a base mecanicista para a diferente modulação exercida pelas

catecolaminas nas células Th1 e Th2 (ELENKOV & CHROUSOS, 1999). Catecolaminas, através de receptores beta-adrenérgicos presentes em células Th1, são capazes de suprimir a resposta imune Th1, aumentando assim a resposta imune Th2 (ELENKOV & CHROUSOS, 1999). Os linfócitos e monócitos expressam receptores β e α adrenérgicos que ao se ligarem a NA modulam seu microambiente, sua proliferação e sua função. As catecolaminas têm sido relacionadas à ativação de células B e produção de anticorpos via receptores β . O aumento ou diminuição na produção de anticorpos depende se a ativação de célula B é precoce ou tardia. Esse mecanismo de ativação é regulado pela NA liberada do nervo esplênico. Essa NA é aumentada pela estimulação do nervo vago sensorial ou ainda pelos próprios nervos esplênicos (CHAVAN & TRACEY, 2017).

Espera-se que o efeito do sistema nervoso simpático nas células imunes seja exercido durante diferentes tipos de respostas imunes, já que os linfócitos expressam receptores noradrenérgicos também diferentes em uma determinada resposta imune-adaptativa (REY & BESEDOVSKY, 2017).

1.2. 3. Neuroimunomodulação Parassimpática Vagal

As fibras aferentes do nervo vago possuem seus corpos celulares no gânglio nodoso e no jugular, tendo suas terminações axônicas periféricas nos órgãos internos, vias aéreas, pulmão, trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, ductos biliares e veia porta. Enquanto que as terminações axônicas centrais projetam-se predominantemente para o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo motor dorsal do vago (DMN), área postrema e outros. Os aferentes vagais são cerca de 80% nervo vago, tendo os neurônios do gânglio nodoso inervando abundantemente os órgãos viscerais e os do gânglio jugular inervando principalmente as vias aéreas e o esôfago. Com base na resposta fisiológica, as fibras aferentes sensoriais vagais são agrupadas em químico-sensíveis (em menor proporção) e mecano-sensíveis, representadas pelas fibras C (nociceptores) (CHAVAN et al, 2017).

Os eferentes vagais permitem que a comunicação cérebro-periferia tenha uma importante função reguladora. São originados no DMN e núcleo ambíguos na medula alonga do tronco cerebral. Os eferentes vagais do DMN projetam-se para os órgãos viscerais da cavidade torácica e abdominal (pulmão, coração, rins, fígado, trato gastrointestinal e pâncreas), e os eferentes vagais do NA predominantemente inervam o coração (CHAVAN et al, 2017).

A inervação vagal de órgãos linfóides, como baço, timo e fígado é uma forte indicação morfológica de que esse ramo do sistema nervoso autônomo poderia interagir com células imunes. Estudos funcionais, utilizando protocolos de estimulação vagal comprovam tal interação, sendo que a estimulação elétrica direta do nervo vago *in vivo* durante endotoxemia letal induzida por LPS ou por punção do intestino em ratos promoveu uma menor síntese de TNF α no fígado, aboliu o pico de TNF α e preveniu o choque circulatório (BOROVIKOVA et al., 2000). Huston e seus colaboradores (2006) mostraram que o ramo vagal que provoca a supressão de citocinas converge para o baço. Potenciais elétricos conduzidos pelo nervo vago alcançam o gânglio celíaco, e via nervos simpáticos chegam ao baço (HUSTON et al., 2006). Já Rosas-Ballina e colaboradores (2011) observaram que dentro do baço, as catecolaminas liberadas por terminações noradrenérgicas parecem ativar células T CD4⁺ produtoras de acetilcolina. Assim, a acetilcolina exerceria efeitos imunossupressores sobre macrófagos esplênicos, reduzindo TNF α e a inflamação sistêmica (ROSAS-BALLINA al., 2011). Registros adicionais também demonstram que a estimulação vagal inibe as citocinas pró-inflamatórias e melhora as lesões inflamatórias em diferentes tipos de modelos de doenças, como sepse, isquemia-reperfusão, artrite, pancreatite, etc. (TRACEY, 2009). Estas funções anti-inflamatórias dos nervos vagais eferentes permitiram a Tracey e colaboradores proporem o conceito de regulação reflexa neural da inflamação (TRACEY, 2009).

1.2. 4. Reflexo inflamatório

O reflexo inflamatório transmite potenciais de ação para o sistema reticulo-endotelial via nervos vago e esplênico, sendo composto de três componentes, o receptor sensorial, sistema nervoso central e arco motor ou eferente. Este envia os sinais do sistema nervoso central para o sistema periférico que reflexamente regula a resposta imune inata e adaptativa (CHAVAN & TRACEY, 2017).

As fibras aferentes vagais são importantes sensores do microambiente inflamatório. Moléculas inflamatórias como LPS e IL-1 ativam fibras nervosas vagais aferentes, conduzindo informação sensorial ao sistema nervoso central, que integra todos os tipos de informação sensorial. As fibras eferentes vagais pre-ganglionares originadas nesses núcleos centrais interagem com as pós-ganglionares próximos ou dentro dos órgãos por meio da liberação de Ach. As fibras pós-ganglionares

predominantemente liberam Ach, por meio dos receptores muscarínicos expressos nos órgãos. Mas ao contrário dessa função clássica, o nervo vago, pode mediar a função anti-inflamatória por meio dos receptores nicotínicos alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) expresso em células do sistema imune, o que é chamado de via anti-inflamatória colinérgica. Os componentes aferentes e eferentes deste reflexo são integrados centralmente através de interações neurais no núcleo do trato solitário, núcleo ambíguo e núcleo dorsal motor do vago, além de outras conexões no tronco cerebral e hipotálamo (Figura 3) (WATKINS et al., 1995; TRACEY; 2009; REY e BESEDOVSKY, 2017; CHAVAN et al, 2017).

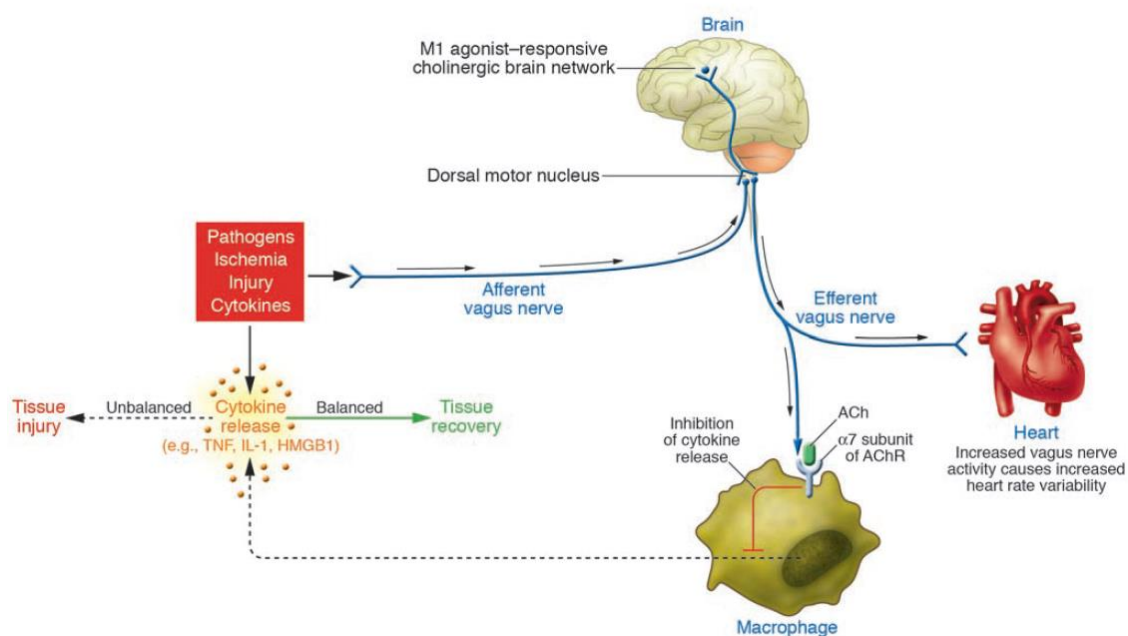


Figura 3: O reflexo inflamatório. O circuito neural que envolve a via colinérgica anti-inflamatória equilibra a produção de citocinas. Agentes patogênicos, bem como a isquemia e outras formas de lesão ativam a produção de citocinas, que normalmente restaura a homeostase. Se a resposta de citocinas é desequilibrada ou excessiva, estes mediadores podem causar doenças. Sinais eferentes do nervo vago, que pode ser controlado por redes cerebrais, inibem a produção de citocina por meio das vias dependentes da subunidade $\alpha 7$ do AChR em macrófagos e outras células do sistema imune. A atividade do nervo vago eferente também aumenta a variabilidade da frequência cardíaca instantânea. Uma rede que envolve que envolve receptores muscarínicos M1 pode aumentar a atividade da via colinérgica anti-inflamatória e também aumentar a variabilidade da taxa cardíaca instantânea. Os sinais aferentes realizados via nervo vago podem ativar uma resposta eferente que inibe a liberação de citocinas, o denominado reflexo inflamatório. (Fonte: TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *Journal Clinical Investigation*, v. 117, p. 289–296, 2007.

1.3. NEUROIMUNOMODULAÇÃO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA

Considerando-se tanto os efeitos imunomodulatórios da inervação simpática quanto o reflexo vagal inflamatório descrito acima, uma nova interpretação para a forte correlação positiva entre a infiltração inflamatória e a intensidade de disfunção autonômica na doença de Chagas foi proposta pelo nosso grupo (MACHADO et al, 2012). Esta nova interpretação baseia-se na visão de que a denervação/disfunção autonômica simpática e parassimpática contribui para uma maior magnitude da resposta inflamatória e, possivelmente, eliminação do parasito. Em outras palavras, a denervação/disfunção autonômica cardíaca com a evolução da doença acentuaria o processo inflamatório no coração do hospedeiro, que, por sua vez, conduziria à destruição de gânglios autonômicos, dando início a um circuito de retroalimentação positivo que pode resultar em alterações elétricas e mecânicas importantes do coração, e, em situação extrema, pode levar à morte súbita do paciente. O mecanismo detalhado acima, proposto pelo nosso grupo (MACHADO et al, 2012; CUBA et al, 2014), resgata a teoria neurogênica da cardiopatia chagásica proposta por Koberle, bem como unifica as demais teorias propostas.

O suporte para essa hipótese veio de registros clínicos ou experimentais que demonstraram que a estimulação vagal, elétrica ou farmacológica, inibe citocinas pró-inflamatórias e melhora o prognóstico de doenças como sepse, choque hemorrágico, isquemia miocárdica, artrite experimental, etc. (TRACEY, 2009). Li e colaboradores (2004) demonstraram que a estimulação elétrica crônica de nervos eferentes vagais aumentou a sobrevivência de ratos com insuficiência cardíaca congestiva devido ao infarto do miocárdio causado por ligadura da artéria coronária esquerda. Em 2011, Springer lançou a hipótese de que este efeito benéfico apresentado por Li e colaboradores (2004) poderia estar relacionado à via colinérgica anti-inflamatória. A estimulação desta via poderia reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, que estão elevados neste modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva (FRANCIS et al., 2004).

Pacientes com doenças autoimunes, como diabetes tipo I, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmicos, apresentam disfunção autonômica. Outras doenças inflamatórias, incluindo doença de Crohn e sepse, também estão associadas à disfunção autonômica (BENARROCH, 2009). Existe a possibilidade de que esta disfunção

autônoma observada nestas doenças seja um evento primário, causando superprodução de citocinas pró-inflamatórias em resposta a antígenos específicos.

Particularmente na doença de Chagas, é possível que a disautonomia seja um evento secundário à marcante inflamação observada na fase aguda. Após esta fase, com uma disautonomia estabilizada, um importante ramo do reflexo inflamatório é perdido, causando um mecanismo de feedback positivo no qual a disautonomia aumenta a inflamação, o que, por sua vez, aumenta novamente a disautonomia, e assim sucessivamente. Este processo poderia ser efetivo para eliminar o parasita, mas poderia também ser perigoso para o cardiomiócito, elevando o dano miocárdico.

Modificações deliberadas na função do sistema nervoso autônomo, antes ou durante a fase aguda da doença de Chagas, podem ser induzidas por meio de estratégias diferentes. Em uma investigação original apresentada por nosso grupo (MACHADO et. al., 2012), nós utilizamos camundongos nocauteados (KO, *knockdown*) para o transportador vesicular de acetilcolina (camundongos KOVACHT) e portanto como menos acetilcolina disponível no coração, bem como camundongos KO para o receptor β 2-adrenérgico (KO β 2), com o intuito de investigar os efeitos da resposta imune ao *T. cruzi* e a inflamação no tecido cardíaco. Paralelamente, em outros grupos de camundongos selvagens, durante a fase aguda da infecção, os animais foram continuamente tratados com brometo de piridostigmina, um agente anticolinesterásico que potencia a sinapse colinérgica, ou salbutamol, um agonista β 2-adrenérgico. E pode-se evidenciar uma parasitemia e parasitismo tecidual cardíaco significativamente menores associado a uma maior infiltração inflamatória nos animais do grupo de camundongos *knockdown* para o transportador vesicular de acetilcolina chagásicos (KOVACHT-CHG), bem como uma parasitemia e parasitismo tecidual cardíaco significativamente maiores juntamente com menor grau de inflamação nos animais chagásicos tratados com brometo de piridostigmina (PIR-CHG). Ao investigar o papel do sistema nervoso autônomo simpático sobre a evolução da parasitemia, do parasitismo tecidual cardíaco e da inflamação nos animais infectados, observou-se uma parasitemia e parasitismo tecidual cardíaco significativamente maiores e uma menor inflamação tanto nos animais do grupo de camundongos *knockout* para o receptor β 2-adrenérgico chagásicos (KO β 2-CHG), quanto nos animais chagásicos tratados com salbutamol (SALB-CHG).

Nossos resultados parecem confirmar que o sistema nervoso autônomo exerce um importante papel na modulação da resposta imune ao *T. cruzi*, com um enorme

impacto sobre a morbi-mortalidade de camundongos chagásicos (MACHADO et al, 2012). Tais resultados vão ao encontro de vários outros estudos que têm relatado que o sistema nervoso tem uma função fundamental de regular a resposta imune em uma ampla variedade de doenças. Entretanto, os mecanismos pelos quais o sistema nervoso autonômico é acionado para modular a resposta imune, seja via mecanismos centrais diretos ou via mecanismos reflexos periféricos, ainda não são completamente conhecidos, seja num contexto geral, seja no contexto em particular da doença de Chagas. Uma maneira de tentar distinguir entre mecanismos centrais diretos e mecanismos reflexos periféricos seria através da avaliação dos efeitos de uma intervenção sobre a função das fibras sensoriais periféricas e as eventuais consequências sobre os efeitos autonômicos no sistema imune. Já é bem conhecido que os neuropeptídeos como substância P (SP), encontrados em terminações nervosas sensoriais, regulam funções imunes, aumentando a proliferação de células T, a produção de imunoglobulinas por células B e de citocinas como Il-12, Il-10 e TNF α (ERIN et al, 2015). Esses peptídeos podem ser liberados após sensibilização dessas fibras nervosas sensoriais tipo C, sensíveis à capsaicina, contribuindo especificamente para desordens inflamatórias, atuando no local (ERIN, 2004).

1.4. CAPSAICINA

A capsaicina (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é um composto natural extraído de plantas do gênero *Capsicum sp.*, da família Solanacea, e é o componente ativo das pimentas vermelhas e pimentas “chili”, provocando uma sensação de dor e queimadura, e tem sido principalmente usada como especiaria, aditivo alimentar e como fármaco. É metabolizada pelo fígado, gerando produtos intermediários reativos potencialmente tóxicos como epóxidos, quinonas e radicais fenoxi, que são inibidores do sistema citocromo P450 CYP2E1 (OYAGBEMI et al, 2010). A capsaicina atua devido a sua especificidade ao receptor vaniloide tipo 1 (VR1) nas fibras nervosas sensoriais, ativando-as ou destruindo-as, dependendo da dose, tempo e vias de administração (ERIN, 2004). Os seus efeitos na carcinogênese e na mutagênese tem sido amplamente documentados, mostrando em sua maioria efeitos inibitórios no desenvolvimento do câncer em múltiplos órgãos como estômago, pulmão, fígado. Esses efeitos estão associados a inativação de fatores de transcrição eucariótico, como o fator nuclear kappa β (NF-kB), o ativador de proteína 1 (AP-1), o que terminaria em um

aumento de apoptose e diminuição de proliferação celular. Além disso, a capsaicina pode atuar diretamente no ciclo celular, bloqueando a via G1- S, parando a progressão do ciclo celular e também bloqueando a fosforilação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo assim considerada um fator anti-tumor (OYAGBEMI et al, 2010).

Tem sido discutido a capacidade da capsaicina de modular a atividade dos mediadores pró-inflamatórios e as cascatas de sinalização intracelular, interferindo em vários fatores de transcrição como o NF-kB, proteína relacionada a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica, inflamação e sobrevivência celular. Diante de estímulos como citocinas, quimiocinas, agentes infecciosos, dano de DNA, são ativadas cascatas de sinalização nas quais o NF-kB sofre uma translocação para o núcleo da célula, levando ao processo que culmina na expressão de genes relacionados a resposta imune, e a capsaicina impede essa translocação. Alguns estudos também têm mostrado que a capsaicina suprimiu em várias formas de câncer, a translocação nuclear e atividade ligante-DNA do ativador de transcrição (STAT) 3, este relacionado a expressão de genes envolvidos em processos de sobrevivência e proliferação celular, quimioresistência e angiogênese (OYAGBEMI et al, 2010).

Diante do exposto acima, observa-se que capsaicina tem mostrado efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiproliferativos e anti-câncer, bem como efeitos quimiopreventivo em doenças inflamatórias crônicas. Erin e seus colaboradores mostraram que a desnervação feita com capsaicina de neurônios sensoriais levou ao aumento de metástase da linhagem celular 4 T1 de câncer de mama em murinos, especificamente metástase miocardial, e que injeções dessas células tumorais pós capsaicina feitas em animais controles, tinham um fenótipo mais agressivo, produzindo significativamente mais metástase no coração, fígado, rim e adrenal (ERIN et al, 2004; ERIN et al, 2006). Já Lu e seus colaboradores (2010) mostraram o efeito imediato da capsaicina no câncer de cólon *in vitro* e *in vivo*, apresentando um efeito anti-tumor, através da indução de efeitos citotóxicos dependentes de dose e tempo, levando um aumento de espécies reativas de oxigênio e cálcio, com diminuição do potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente à apoptose (LU et al, 2010). Enfim a capsaicina tem vários efeitos anticancerígenos que foram evidenciados tanto em animais quanto *in vitro*. Mas alguns autores relatam que a capsaicina tem efeitos cancerígenos, como o aumento da proliferação e migração de células tumorais dependendo da dose e

do período em que é administrado, o que também limita seu uso na clínica (CAO, 2015).

Além destes efeitos diretos da capsaicina, tem sido demonstrado já há décadas o potencial deste fármaco em promover destruição de fibras sensoriais do tipo C, quando administrada em altas doses (JOO et al., 1969; SZOLCSÁNYI et al., 1975; JANCÓS & KIRÁLY, 1981). Tal destruição decorre da excessiva ativação dos receptores vanilóides VR1 na membrana neuronal, com intensa mobilização de cálcio extracelular para o interior do neurônio e a consequente ativação de vias excito-tóxicas, incluindo o desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial, com queda na produção de ATP e aumento do estresse oxidativo, que culmina com a destruição das terminações sensoriais do tipo C (DEDOV & ROUFOGALIS, 2000). Se a capsaicina em alta dose for administrada em animais de laboratório neonatos, onde os receptores VR1 estão distribuídos ao longo de toda a membrana plasmática dos neurônios sensoriais do tipo C ainda imaturos, ocorre a destruição excito-tóxica definitiva das fibras C (em toda a sua extensão, incluindo o axônio periférico, o corpo celular e o axônio central) e portanto uma desnervação permanente (FAULKNER & GROWCOTT, 1980; SCADDING, 1980). Por outro lado, se a administração de capsaicina for feita num animal adulto, onde os receptores VR1 estão presentes apenas na terminação sensorial periférica, uma desnervação temporária (de alguns dias a poucas semanas) será observada (JANCÓS et al., 1980). A desnervação é temporária porque os corpos celulares dos neurônios do tipo C permanecem intactos frente à capsaicina, por não apresentarem receptores VR1 em sua membrana plasmática, sobrevivendo uma reinervação após algumas semanas. Por conta destes efeitos, a capsaicina tem sido amplamente usada como uma ferramenta metodológica experimental para induzir de forma permanente ou temporária a desnervação seletiva de fibras C e assim estudar o papel funcional destas fibras sensoriais em diferentes contextos fisiológicos ou fisiopatológicos (JOO et al., 1969; SZOLCSÁNYI et al., 1975; JANCÓS & KIRÁLY, 1981). Ademais, tal efeito indutor de desnervação de fibras C nociceptivas tem sido usado clinicamente no tratamento de algumas formas de cefaléia e de dores neuropáticas em seres humanos (HAWK & MILLIKAN, 1988; LEVY, 1995). A presente tese tem como pergunta central a seguinte: a desnervação de fibras sensoriais do tipo C teria algum impacto sobre a modulação reflexa autonômica do sistema imune e consequentemente sobre a evolução da doença de Chagas? Nada foi encontrado nada na literatura sobre este assunto.

2. JUSTIFICATIVA

Dados experimentais coletados pelo nosso grupo mostram claramente que neurotransmissores e respectivos receptores relacionados ao sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, estão associadas à modulação da resposta imune ao *T. cruzi* durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental em camundongos (MACHADO e DIAS DA SILVA, 2012; MACHADO et al, 2012, CUBA et al, 2014). Entretanto, o papel funcional de vias sensoriais sensíveis à capsaicina, que desempenham forte influência modulatória reflexa na atividade do sistema simpático e vagal, no curso da infecção por *T. cruzi* não foi ainda estudado.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da inervação sensorial de fibras sensíveis à capsaicina, na fase aguda da doença de Chagas em camundongos, avaliando-se parâmetros parasitológicos, funcionais eletro- e ecocardiográficos e histopatológicos do coração, além de parâmetros imunológicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da desnervação sensorial de fibras C induzida pela capsaicina sobre a parasitemia, na infecção experimental aguda pelo *T. cruzi* em camundongos.
- Investigar o efeito da desnervação sensorial de fibras C induzida pela capsaicina nos parâmetros eletro- e ecocardiográficos, na infecção experimental aguda pelo *T. cruzi*, de camundongos.
- Determinar as alterações histopatológicas cardíacas, tais como o processo inflamatório e o parasitismo tecidual nos camundongos infectados pelo *T. cruzi* com e sem desnervação sensorial de fibras C induzida pela capsaicina.
- Avaliar o efeito da infecção aguda por *T. cruzi* nos parâmetros imunológicos em camundongos chagásicos com e sem desnervação sensorial de fibras C induzida pela capsaicina, por meio de imunofenotipagem das células do baço e determinação de citocinas séricas.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Camundongos Balb/c e C57BL/6 adultos fêmeas livre de germes específicos (“specific pathogen free” -spf) entre 6 e 8 semanas (pesando de 25 a 30 g), foram adquiridos do biotério do Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. Esses animais foram mantidos no biotério de experimentação da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG.

Os animais receberam cuidados adequados em conformidade com o "Principles of Laboratory Animal Care" formulado pela “National Society for Medical Research” da Inglaterra, com o "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" preparado pelo “National Institute of Health” dos E.U.A. [DHEW publicação no. (NIH) 80-123, revisado, 1978] e com a normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM, sendo mantidos com temperatura e luminosidade controladas, com livre acesso a ração e água. Foram acondicionados em microisoladores, autoclavados, além de ração e água autoclavadas. A execução dos experimentos foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM (protocolo número 391).

4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais de acordo com a presença ou não de infecção chagásica e de desnervação de fibras sensoriais do tipo C com capsaicina. Foram utilizados animais da linhagem Balb/c, que representam o perfil susceptível à infecção pelo *T.cruzi* (cepa Colombiana) e animais da linhagem C57BL/6, que representam o perfil resistente à infecção pelo *T.cruzi* (cepa Colombiana).

Seguem os seis grupos experimentais detalhados abaixo. Não foi possível realizar a mesma distribuição experimental dos grupos Balb/c nos animais C57BL/6, ou seja, o grupo de camundongos C57BL/6 desnervados não existe, pois esses apresentaram 100 % de mortalidade durante protocolo piloto de desnervação química induzida pela capsaicina em adultos, nesse estudo.

GRUPO I (NCP CT, n=10): Camundongos Balb/c inoculados com sangue de camundongo não infectado, não tratados com capsaicina.

GRUPO II (NCP CH, n=10): Camundongos Balb/c inoculados via intraperitoneal, com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa *Colombiana* do *T. cruzi*, não tratados com capsaicina.

GRUPO III (CP CT, n=10): Camundongos Balb/c inoculados com sangue de camundongo não infectado, tratados com capsaicina (denervados).

GRUPO IV (CP CH, n=10): Camundongos Balb/c inoculados com sangue de com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa *Colombiana* do *T. cruzi*, tratados com capsaicina (denervados).

GRUPO V (C57 CT, n=10): Camundongos C57BL/6j inoculados com sangue de camundongo não infectado.

GRUPO VI (C57 CH, n=10): Camundongos C57BL/6j inoculados com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa *Colombiana* do *T. cruzi*.

4.3. DESENHO EXPERIMENTAL

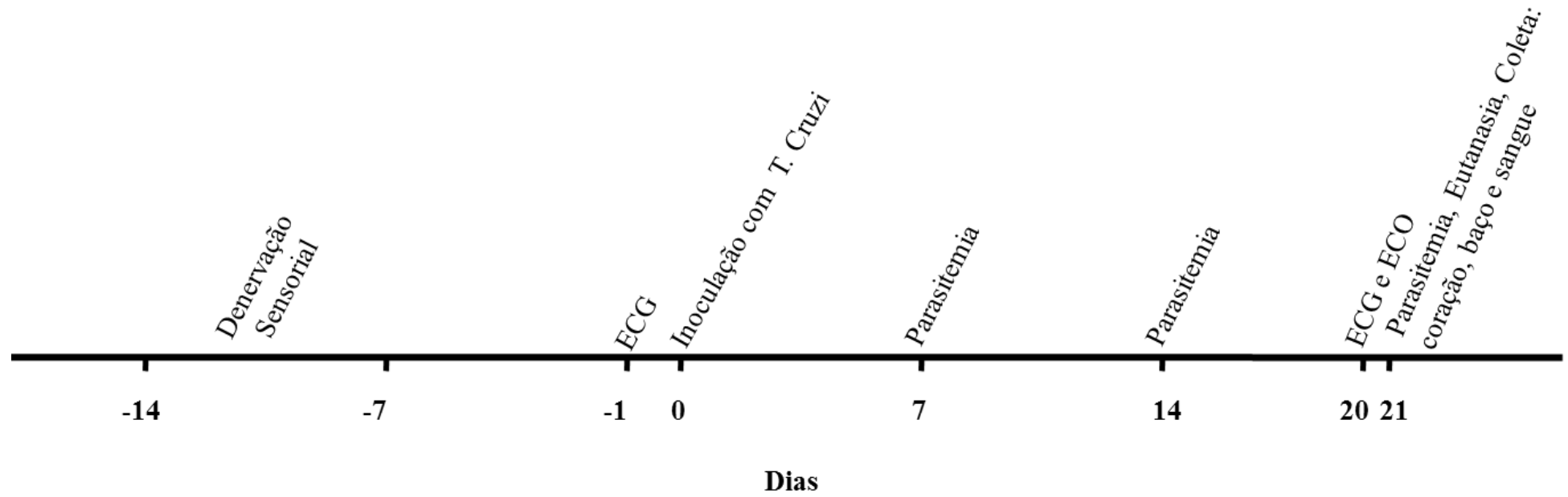


Figura 4: Desenho experimental/ Cronograma de execução do Experimento

4.4. DEAFERENTAÇÃO POR CAPSAICINA

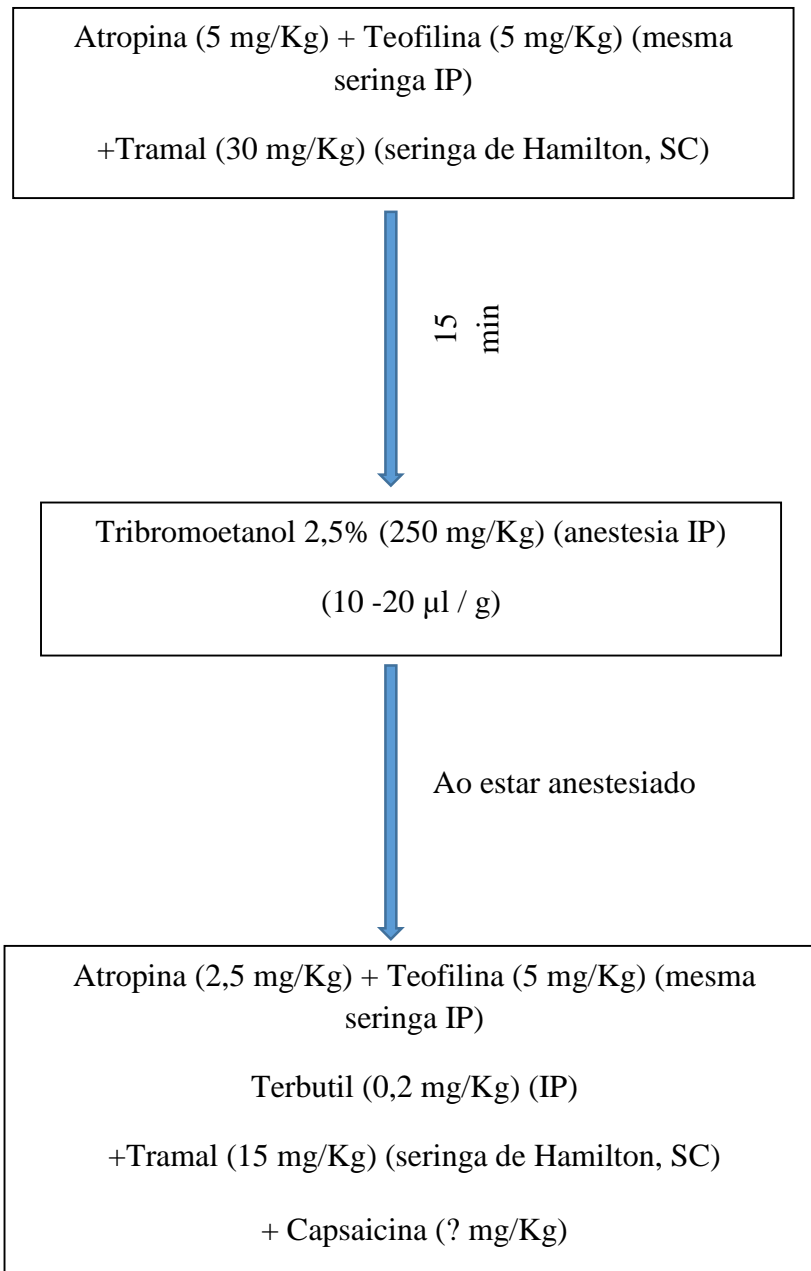
Camundongos C57BL/6 e BALB/c adultos (6-8 semanas), foram submetidos ao procedimento de denervação sensorial química por capsaicina (Aldrich), a qual foi administrada na dose de 150 mg/Kg. Essa dose de capsaicina foi dividida em 5 dias, sendo que a administração foi feita por meio de injeções subcutânea diluída em uma solução de 10% etanol, 10% Tween 80 e 80% soro fisiológico estéril. Grupos controle receberam injeção de veículo usado em animais de mesma idade. Como tal procedimento ocasiona dor moderada a aguda e há um transitório edema agudo de pulmão decorrente à liberação de neuropeptídeos na fenda sináptica, todos os animais foram tratados com Tramal (30mg/Kg; Teuto), Atropina (5mg/Kg; Merck) e Teofilina (5 mg/Kg; Hipolabor) trinta minutos antes da injeção de capsaicina. Após 15 minutos da administração descrita anteriormente, os animais foram anestesiados com Tribromoetanol 2,5% (250 mg/Kg; Aldrich) e seguiu-se a administração de Atropina (2,5 mg/Kg), Teofilina (5 mg/Kg), Terbutil (0,2 mg/Kg; Hipolabor) e Tramal (15 mg/Kg), seguindo a injeção de capsaicina.

Após 7 dias os animais foram avaliados em relação à desnervação sensorial, por meio do teste oftálmico “eye-wiping test”. Esse teste consiste na limpeza dos olhos após a administração de uma solução de capsaicina 0,01% nos olhos dos animais. O procedimento foi realizado com o uso de uma pipeta automática, sendo administrado 20 µL dessa solução em cada olho do animal seguindo a observação e contando o número de movimentos de limpeza defensivos (“wipes”), durante 1 minuto. As fibras C são consideradas dessensibilizadas quando os movimentos defensivos de limpeza estão quase ausentes (1 – 5 movimentos). O animal que apresentou um número de “wipes” inferior a 5 foi considerado desnervado. Após esse procedimento, o olho foi extensivamente lavado com soro fisiológico (ROGERIO, 2011).

Após a confirmação da desnervação sensorial, os animais desnervados e controles foram desafiados com 500 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. E com 21 dias após a infecção, esses animais foram eutanasiados, de acordo com as normas do CEUA, por meio da administração de anestésico Tribromoetanol 2,5 % com uma dose de 250 mg/Kg, via intraperitoneal, seguindo o deslocamento cervical.

A seguir coletou-se o coração para análise histopatológica, coletou-se também o sangue e o baço para análise imunológica.

Protocolo Experimental da Desnervação Sensorial com Capsaicina:



- A dose de Capsaicina varia de acordo com o dia, conforme o protocolo abaixo.

Dose de Capsaicina durante o período de Desnervação Sensorial:

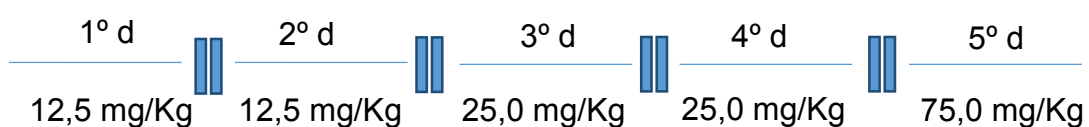


Figura 5: Protocolo Experimental do procedimento de desnervação sensorial de fibras C sensíveis à capsaicina.

4.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Os animais dos grupos chagásicos (Balb/c não desnervado chagásico; Balb/c desnervado chagásico e C57 não desnervados chagásico) foram pesados e a seguir infectados pela inoculação intraperitoneal (i.p.) de 500 formas tripomastigotas sanguíneas/0,1 mL da cepa Colombiana do *T. cruzi*, obtidas por meio da coleta de sangue do plexo orbital de camundongos swiss na fase aguda da infecção, de acordo com a técnica de Brener et al. (1962). Após a infecção, os animais foram alojados em gaiolas plásticas, onde tiveram livre acesso à ração (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR) e à água autoclavadas. Os animais dos grupos não chagásicos (Balb/c não desnervados e não infectados, Balb/c desnervados e não infectados e C57 não desnervados e não infectados), de mesmo peso inicial e sexo, receberam por via i.p. 0,1 mL de sangue coletado do plexo orbital de camundongos não infectados. Estes animais constituíram o grupo controle em relação à infecção pelo *T. cruzi*. Ambos os animais infectados e controles foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais.

4.5.1. Característica da Cepa Colombiana do *T. cruzi*

As cepas do *T. cruzi* possuem variações intraespecíficas em nível morfológico, biológico, bioquímico e genético. Isso poderia explicar a variabilidade nas manifestações clínicas da doença de Chagas e as diferenças regionais de sua morbidade. São populações multiclonais, com diferenças em sua patogenicidade e virulência, assim como no histotropismo e resposta a terapias. De acordo com essas diferenças, as cepas são agrupadas em biotemas I, II e III correspondentes a zimodemas específicos, Z1, Z2 e Z3, e atualmente em “discrete typing units” (DTUs) incluídas em 6 grupos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI. E o tropismo tecidual é uma característica intrínseca das cepas de *T. cruzi* (DEVERA, 2002; CAMANDARROBA, 2006). DTUs são definidas de acordo com características genéticas incomum, sendo identificadas por marcadores genéticos, moleculares e imunológicos comuns e sua classificação está relacionada à genética molecular, características eco-epidemiológicas e patogenicidade. (ZINGALES, 2009; ZINGALES, 2012).

A cepa Colombiana do *T. cruzi*, faz parte de acordo com as DTUs, grupo TcI, sendo constituído por cepas com características de formas largas de baixa multiplicação e picos de parasitemia tardios (20 e 30 após a infecção), com um acometimento da musculatura esquelética e uma mortalidade tardia com baixa taxa (50 dias após a infecção). Segundo

Camandaroba, a cepa Colombiana apresenta um tropismo intenso para o miocárdio e músculos esqueléticos, com lesões intensas encontradas no período de 20 a 30 dias de infecção, ou seja na fase aguda da doença de Chagas. Entretanto vários órgãos e tecidos também mostram ninhos de amastigotas no citoplasma de macrófagos, células adiposas, músculo liso da parede intestinal e plexo. A TcI é a mais abundante e amplamente dispersa de todas as DTUs de *T. cruzi* nas Américas. Encontrado em toda a faixa de distribuição vetorial de triatomíneos e pode estar associado a ciclos silvestres e domésticos. A infecção humana por TcI está concentrada no norte das Américas do Sul e Central e está associada à cardiomiopatia chagásica. (DEVERA, 2002; CAMANDAROBA, 2006; ZINGALES, 2012).

Devido a intensa miocardite é considerada patogênica à camundongos. De acordo com Michailowsky e seus colaboradores (2001), em camundongos infectados pelo *T.cruzi*, a patologia da doença de Chagas é altamente dependente da cepa do parasito e de seu inóculo, juntamente com fatores genéticos e resposta imune do hospedeiro, sendo que citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , Il-12 e NO são importantes para resistência do hospedeiro à infecção pelo *T.cruzi*. Nesse sentido, utilizamos em nossos experimentos o já bem estabelecido modelo experimental de resistência e suscetibilidade à miocardite chagásica aguda em animais de fundo genético C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, consequente a infecção pela cepa Colombia de *T.cruzi* (MICHAILOWSKY, 2001; ZINGALES, 2012).

4.6. PARASITEMIA

Foram quantificados parasitos circulantes no sangue periférico no 7º, 14º e 21º dias após a infecção. A técnica de contagem, foi adaptada de Brenner et al (1962). Os animais foram imobilizados em suporte de plástico. A extremidade da cauda do animal foi seccionada e 5 microlitros (μ L) de sangue depositada entre lâmina e lamínula (22x22cm). A contagem manual dos parasitas foi realizada em 50 campos microscópicos. Para a obtenção do valor aproximado do número de parasitas por mililitro de sangue, o número de parasitas/50 campos foi multiplicado pelo fator 1052, com a finalidade de se obter curvas parasitêmicas dos animais inoculados, correspondente ao número de parasitas por mililitro de sangue (nº parasita/ mL de sangue)

4.7. ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO CONVENCIONAL

Para a realização do estudo eletrocardiográfico convencional, no 21 ° dia após a infecção, os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (2,5 %) com uma dose de 250 mg/Kg, via intraperitoneal. A seguir foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa para o registro do ECG. O registro eletrocardiográfico foi realizado utilizando-se um amplificador de alto ganho (Bioelectric Amplifier, model 8811A, Hewlett-Packard Med. Inst., Whaltam, MA, USA) e um sistema de aquisição de dados (placa de conversão analógico-digital, modelo CAD 12/36 e software Aqdados ambos da Lynx Tecnologia Eletrônica Ltda., São Paulo, SP) acoplados a um computador . Pequenos eletrodos em agulha foram conectados ao animal segundo o padrão estabelecido para obtenção das derivações clássicas (D1, D2, D3, aVR, aVL, aVF). As derivações precordiais foram as seguintes: VA = eletrodo colocado no 4° espaço intercostal direito sobre a linha hemiclavicular; VB = eletrodo no 5° espaço intercostal esquerdo na linha hemiclavicular; VC = eletrodo no 5° espaço intercostal esquerdo na linha axilar anterior (BESTETTI, 1987;1988).

O registro eletrocardiográfico basal foi realizado em todos os grupos experimentais estudados no primeiro dia que antecede a infecção, e ao final do protocolo experimental, no 21° dia (fase aguda) após a infecção.

Foi realizada a análise das seguintes variáveis dos ECGs: a) duração do intervalo RR (iRR) em D2; b) duração da onda P (dP) em D2, D3, aVF e VB; c) duração do intervalo PR (iPR) em VB; d) duração do complexo QRS (QRS) em todas as derivações; e) duração do intervalo QaT (iQaT); e f) duração do intervalo QaT corrigido segundo a equação de Bazett [$iQaTc = iQaT/raiz(iRR)$]. Os cálculos de duração e amplitude dos parâmetros eletrocardiográficos foram realizados empregando-se o software Aqdados. Além destes parâmetros, também foram analisados por inspeção do traçado do registro de ECG, a presença de arritmias cardíacas, bloqueios átrios-ventriculares e intra-ventriculares entre outras alterações.

4.8. ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO

Todos os grupos de animais foram submetidos, no 21° dia após a infecção, à avaliação ecocardiográfica (ECO) nos modos bi-dimensional, modo-M e modo Doppler de onda pulsada, utilizando um sistema de ecocardiografia de alta resolução específico para roedores (Vevo 2100 Imaging System, VisualSonics-Fujifilms, Toronto, Canadá) acoplado a um transdutor 56 ultrassônico de arranjo linear de 30MHz (modelo MS400, VisualSonics-Fujifilms, Toronto, Canadá).

Para a realização do registro ecocardiográfico, os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5 % com uma dose de 250 mg/Kg, via intraperitoneal. Uma tricotomia foi realizada na região precordial de modo a eliminar todos os pelos torácicos e facilitar a transmissão das ondas ultrassônicas. Após verificar o aprofundamento anestésico, os animais foram dispostos em decúbito dorsal sobre a mesa para registro do ECO, a qual dispunha também de pequenos eletrodos em pás para registro simultâneo de ECG e respiração (quantificada via impedância elétrica corporal) e de um termistor introduzido no canal anal, a fim de monitorizar e servo-controlar o aquecedor automático da mesa de registros, para manter a temperatura corporal do animal estável em 37°C durante o registro ultrassônico.

O transdutor ultrassônico foi fixado na região precordial de modo a produzir uma visão para-esternal de eixo longo, a qual permite visualizar o ventrículo esquerdo, o septo interventricular, parte do ventrículo direito e átrios. A frequência cardíaca no momento da coleta de imagens foi quantificada online a partir dos intervalos RR do ECG. Para as estimativas dos parâmetros ecocardiográficos foram utilizados os animais com frequência cardíaca acima de 400bpm. Os seguintes parâmetros foram medidos no modo bidimensional: SIV = Espessura do septo interventricular; DIVE = Diâmetro interno do ventrículo esquerdo; PPVE = Espessura da parede posterior do VE; FC = Frequência cardíaca; DC = Débito Cardíaco; DIAE = Diâmetro interno do átrio esquerdo; massa ventricular esquerda estimada. Os volumes ventriculares esquerdos no final da sístole e da diástole, bem como a fração de ejeção e fração de encurtamento foram calculados a partir dos parâmetros quantificados no modo bi-dimensional usando a fórmula de Teichholz. No modo M foram avaliados: SIV = Espessura do septo interventricular; DIVE = Diâmetro interno do ventrículo esquerdo; PPVE = Espessura da parede posterior do VE e DIVD = Diâmetro interno do ventrículo direito. Ao final, usando o modo de Doppler de onda pulsada sobre a válvula mitral, os seguintes parâmetros foram estimados: VVE = Velocidade vertical do fluxo de enchimento rápido (E) do VE; Velocidade e tempo de desaceleração da fase E do VE; VVA = Velocidade vertical do fluxo de contração atrial (A) do VE; Razão E/A = razão entre VVA e VVE; ITV = Integral tempo velocidade do fluxo da válvula mitral; Velocidades média e de pico do fluxo na válvula mitral; área do anel da válvula mitral e a meia vida temporal do fluxo mitral. Todos esses parâmetros ecocardiográficos foram coletados por pesquisador experiente em ecocardiografia de roedores e não informado da condição clínica dos camundongos.

Todos os parâmetros ecocardiográficos medidos e calculados seguiram as recomendações padronizadas conjuntas das Sociedades Americana e Europeia de Ecocardiografia (LANG et al, 2015).

4.9. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Após o estudo funcional, os animais foram eutanasiados e o coração de cada animal foi retirado, lavado em soro fisiológico a 0,9% e fixado em formalina tamponada a 10%. O coração foi cortado no sentido longitudinal (04 câmaras), desidratados, diafanizados e embebido em parafina. Foram realizadas de um a cinco cortes seriais longitudinais do coração, com 5-7 μm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (HE), para posterior observação ao microscópio óptico (AxioObserver Z1, Carl Zeiss Inc., Germany).

Foi realizada a análise do miocárdio atrial e ventricular. O processo inflamatório foi demonstrado por meio de uma abordagem semi-quantitativa, utilizando-se um sistema de pontuações (“scores”), adaptado de Chapadeiro et al. (1988). A avaliação nas diferentes regiões do coração classificou o grau de infiltrado inflamatório em 4 categorias: ausente (-), discreto (+, “score”=1), moderado (+ +, “score”=2) e intenso (+ + +, “score”=3). O infiltrado inflamatório foi avaliado nos átrios, no ventrículo direito e no ventrículo esquerdo, sendo ao final atribuído um “score” inflamatório total, resultante da somatória dos “scores” determinados para cada região avaliada (CHAPADEIRO et al., 1988).

Em todas as lâminas foram contados os ninhos de amastigota em 10 campos, sendo o somatório do número de ninhos em 10 campos, o resultado final para cada lâmina.

Todas as análises histológicas foram efetuadas de forma cega, ou seja, o pesquisador não tinha ciência dos grupos experimentais a serem avaliados.

4.10. DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS

Ao final do protocolo experimental, foi coletado o sangue de animais de cada grupo, através do plexo orbital, para obtenção do o soro para dosagem de citocinas do perfil Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL-6), quimiocina MCP1 e do perfil Th2 (IL-10). Alíquotas de soro foram separadas e congeladas a -20°C para posterior detecção das citocinas séricas por citometria de fluxo. O ensaio da detecção de citocinas foi realizado no laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

4.10.1 Citometria de Fluxo (Cytometric Bead Array)

O Kit CBA (cytometric beads array) (BD Biosciences) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e quimiocina MCP-1 em uma mesma amostra.

Seis populações de *beads* (microesferas de poliacrilamida) com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACS calibur (BD).

As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as beads de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE (Ficoeritrina), e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para a quantificação das citocinas e quimiocina foram preparados com: 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de beads e 50 μ L do reagente de detecção para anti-TNF- α , anti-IFN- γ , anti-IL-6, anti-IL-10 e anti-quimiocina MCP-1. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogeneizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Após, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS calibur (BD) e os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software Cell Quest (BD).

4.11. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL CELULAR ESPLÊNICO

Ao final do protocolo experimental o baço de cada animal foi retirado de forma asséptica e colocado em placas de petri contendo RPMI-1640 e a seguir levado para o fluxo laminar, para processamento e retirada das células para análise do perfil fenotípico celular.

4.11.1. Preparo da suspensão de células provenientes do baço

A fenotipagem e quantificação das células do infiltrado inflamatório foi realizada a partir do baço, o qual foi coletado e armazenado em placas de Petri contendo meio RPMI 1640 completo, enriquecido com 10 % de SBF, 1 % aminoácidos não essenciais (MEM *non-essential amino acids* solution - Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA), 23,8mM de NaHCO₃, 10,9mM de HEPES, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 500 μ M de β -mercaptoetanol, 100UI/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), pH7,2-7,4.

Os baços foram macerados em uma cell strainer (70 μ m) e lavados com meio RPMI 1640 completo. As células foram centrifugadas (400 xg, 10min, 4°C) e incubadas com 2mL de tampão de lise para lise de hemácias, por 5min a temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 10mL de tampão fosfato de sódio (PBS) e as células centrifugadas novamente. As células foram então transferidas para uma placa de 96 poços (5x 10⁵ células/ poço) e incubadas com 50ng/mL de Phorbol Myristate Acetate (PMA) (Sigma) e 500ng/mL de Ionomicina (Sigma) em meio RPMI 1640 (10%SFB), por 4h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, sendo que após 1h de estímulo foi adicionada Brefeldina A (10ug/mL). Após o estímulo, as células foram recolhidas e centrifugadas (400 XG, 10 min, 4°C) e lavadas com 100uL de PBS (2%SFB).

4.11.2. Imunofenotipagem de células do baço

Para caracterização fenotípica da população de células T CD4 de baço foram utilizados anticorpos contra os antígenos de superfície CD4 e citocinas IFN- γ , IL-13 e IL-17. Para caracterização das células T reguladoras foram usados os anticorpos contra os antígenos de superfície (CD4) ou intracelular (FoxP3).

As células foram então incubadas em 50uL do mix de anticorpos de superfície, por 30min a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas, centrifugadas e incubadas com 100uL da solução de fixação/permeabilização (BD Cytotfix/Citoperm) por 20min a 4°C. Após esse período e centrifugação as células foram lavadas com 100uL da solução de permeabilização (BD PermWash) e então incubadas com o mix de anticorpos para citocinas intracelulares por 40min a 4°C. Após lavagem e centrifugação (400 XG, 10 min, 4°C), as células foram ressuspendidas em PBS (2% SFB). As amostras foram analisadas em um citometro de fluxo BD LSR Fortessa, utilizando o software FacsDiva e então analisadas com o software FlowJo X.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros foram expressos como média (\pm desvio padrão) ou média (\pm erro padrão) ou mediana (e intervalo interquartil), sendo a forma de expressão indicada nas tabelas ou figuras. A comparação entre os grupos após a infecção foi realizada pelo emprego dos testes ANOVA de um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey para dados paramétricos ou pelo ANOVA de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, para dados não

paramétricos. Os dados de parasitemia foram comparados pelo teste de ANOVA de dois fatores (grupo x tempo) para medidas repetidas, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA DESNERVAÇÃO

O número de movimentos de limpeza defensivos após a instilação de solução de capsaicina a 0,01% na conjuntiva ocular (“eye-wiping test”) foi inferior a cinco em todos os animais tratados com capsaicina (100% de eficiência), confirmando a eficácia do procedimento de desnervação química das fibras sensoriais do tipo C.

5.2. AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA

A confirmação da infecção foi realizada pela contagem de parasitas circulantes. Todos os animais inoculados (100%) foram positivos para o *T. cruzi* circulante após a inoculação, confirmando assim a presença da infecção. Obviamente nenhum animal não infectado apresentou parasitas circulantes. As figuras 6 e 7 abaixo mostram a curva de parasitemia ao longo dos 21 dias de seguimento e a área sob a curva dos animais infectados, respectivamente. Elas revelam que os animais infectados da linhagem Balb/c e desnervados apresentaram um menor nível de parasitemia ($15 \pm 1 \times 10^3$ parasitos/mL no 14º dia e $135 \pm 18 \times 10^3$ parasitos/mL no 21º dia, com área sob a curva de $0,805 (0,893) \times 10^3$ parasitos/mL.dia) em comparação aos animais Balb/c infectados não desnervados ($43 \pm 5 \times 10^3$ parasitos/mL no 14º dia e $588 \pm 51 \times 10^3$ parasitos/mL no 21º dia, com área sob a curva de $4,053 (4,001) \times 10^6$ parasitos/mL.dia, $p < 0,05$), indicando que a desnervação sensorial de fibras C, de alguma forma, leva a um melhor controle dos níveis de parasitos circulantes. A parasitemia nestes animais, Balb/c infectados e desnervados, foi semelhante à observada nos animais C57BL/6 infectados ($18 \pm 2 \times 10^3$ parasitos/mL no 14º dia e $77 \pm 7 \times 10^3$ parasitos/mL no 21º dia, com área sob a curva de $0,592 (0,525) \times 10^6$ parasitos/mL.dia, $p = \text{não significativo}$) (Figuras 6 e 7).

5.3. AVALIAÇÃO FUNCIONAL CARDÍACA

Nos animais infectados pelo *T. cruzi* a fase aguda da doença de Chagas foi caracterizada por meio de estudo funcional (eletro e ecocardiograma) e anatômico-microscópico (avaliação histológica).

CURVA DE PARASITEMIA

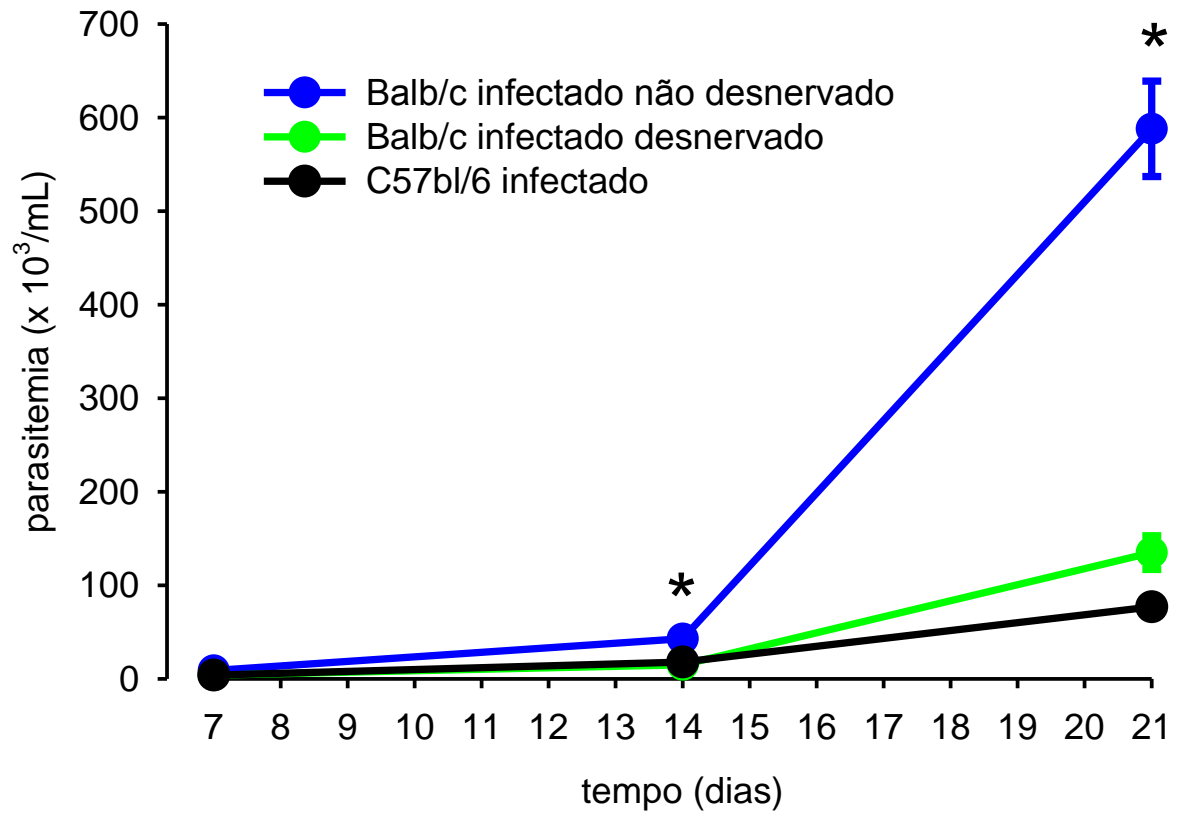


Figura 6: Curva de parasitemia ao longo de 21 dias de seguimento dos animais dos grupos Balb/c chagásico não desnervado e desnervado e do grupo C57BL/6 chagásico. Note a expressiva maior parasitemia nos animais Balb/c chagásicos não desnervados aos 14 e 21 dias em comparação aos outros dois grupos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão. (* $p < 0,05$ versus C57BL/6 infectado e Balb/c infectado desnervado).

PARASITEMIA ÁREA SOB A CURVA

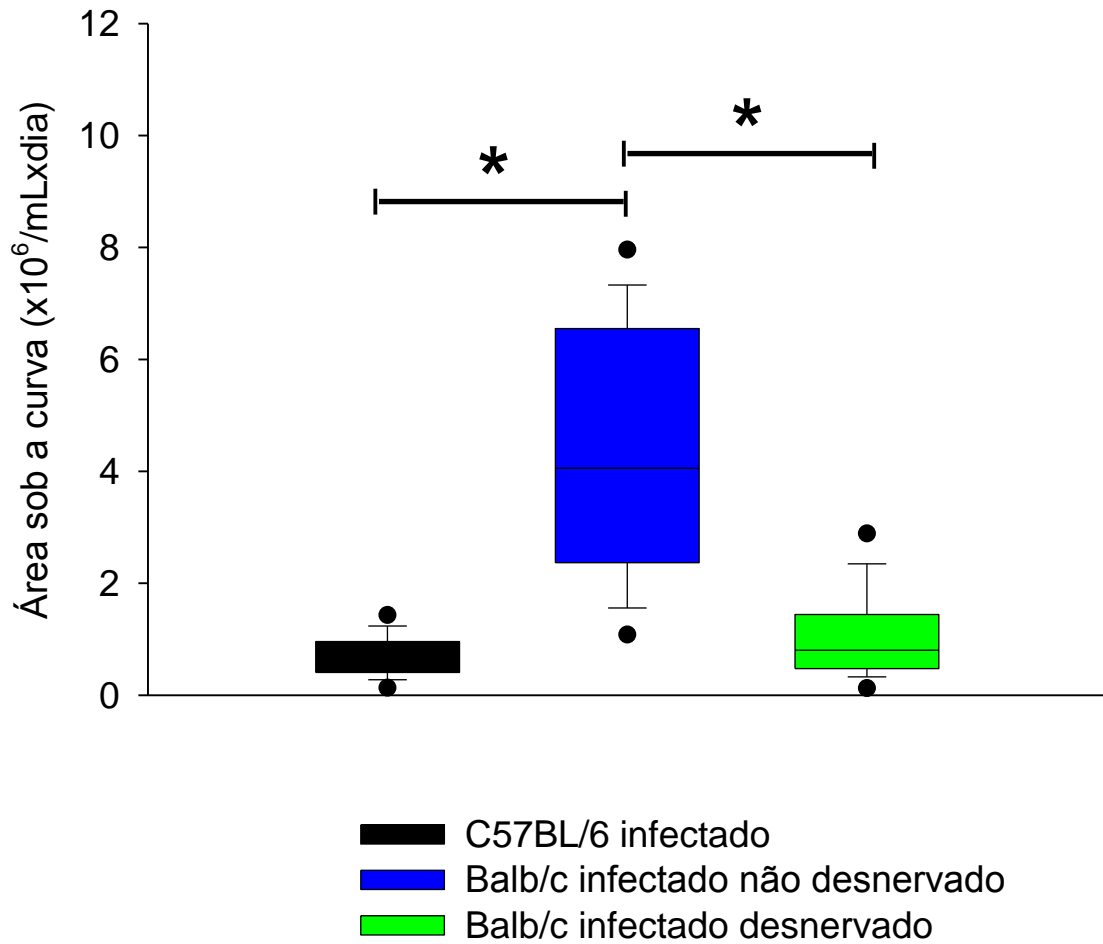


Figura 7: Área sob a curva de parasitemia ao longo de 21 dias de seguimento (expressa como mediana e percentis de 5, 10, 25, 75, 90 e 95%) dos animais dos grupos Balb/c chagásico não desnervado e desnervado e do grupo C57BL/6 chagásico. Note a expressiva maior área sob a curva nos animais Balb/c chagásicos não desnervados em comparação aos outros dois grupos. (* $p < 0,05$ versus C57BL/6 infectado e Balb/c infectado desnervado).

5.3.1. Eletrocardiograma

Ao eletrocardiograma podemos observar que o procedimento de desnervação de fibras C com capsaicina nos animais Balb/c não infectados não promoveu nenhuma diferença nos parâmetros eletrocardiográficos analisados em comparação aos animais Balb/c não desnervados (Tabela 1).

Por outro lado, os animais chagásicos ao final do período de seguimento de 21 dias após a inoculação dos parasitas apresentaram modificações significativas em comparação aos respectivos animais não infectados (Tabela 1). Notadamente, os animais Balb/c infectados não desnervados apresentaram-se com significativos maiores valores de intervalo RR ($153,4 \pm 11,0$ ms versus $123,6 \pm 3,2$ ms nos animais Balb/c não infectados não desnervados, $p < 0,05$), indicando uma bradicardia sinusal, de intervalo PR ($82,6 \pm 9,5$ ms versus $40,6 \pm 0,9$ ms nos animais Balb/c não infectados não desnervados, $p < 0,05$), indicativo de distúrbio de condução no nó átrio-ventricular, da duração do QRS ($12,9 \pm 0,9$ ms versus $11,1 \pm 0,4$ ms nos animais Balb/c não infectados não desnervados), indicativo de distúrbio de condução intraventricular no sistema His-Purkinje, e dos intervalos QT e QT corrigido ($32,0 \pm 3,7$ ms e $2,59 \pm 0,27$ ms^{1/2}, respectivamente, versus $15,5 \pm 1,9$ ms e $1,33 \pm 0,17$ ms^{1/2} nos animais Balb/c não infectados não desnervados, $p < 0,05$), sugestivo de dificuldade de repolarização ventricular, compatível com hipertrofia cardíaca, infiltração inflamatória e fibrose miocárdica. Todas estas alterações em conjunto denotam um acometimento global do coração compatível com uma franca miocardite aguda difusa.

Os animais Balb/c chagásicos desnervados apresentaram-se com quadro eletrocardiográfico alterado em comparação aos animais não infectados desnervados, com significativos maiores valores de duração do QRS ($12,7 \pm 0,4$ ms versus $10,5 \pm 0,3$ ms nos animais Balb/c não infectados desnervados), indicativo de distúrbio de condução intraventricular no sistema His-Purkinje, e do intervalo QT corrigido ($2,39 \pm 0,32$ ms^{1/2} versus $2,07 \pm 0,22$ ms^{1/2} nos animais Balb/c não infectados desnervados, $p < 0,05$), sugestivo de dificuldade de repolarização ventricular, compatível com hipertrofia cardíaca, infiltração inflamatória e fibrose miocárdica. Curiosamente, porém, as alterações observadas foram em menor magnitude em comparação aos animais Balb/c chagásicos não desnervados (tabela 1). Note que os intervalos RR e PR encontram-se menores ($131,8 \pm 9,4$ ms e $51,1 \pm 2,3$ ms respectivamente, versus $153,4 \pm 11,0$ ms e $82,6 \pm 9,5$ ms nos animais Balb/c chagásicos não desnervados, $p < 0,5$). Note também que os intervalos QT e QTc, ainda que aumentados em relação aos animais não infectados desnervados, são significativamente menores do que nos

animais chagásicos não desnervados ($27,0\pm 3,6\text{ms}$ e $2,39\pm 0,32\text{ms}^{1/2}$, respectivamente, versus $32,0\pm 3,7\text{ms}$ e $2,59\pm 0,27\text{ms}^{1/2}$, $p<0,05$) (Tabela 1). Porém, a duração do QRS não foi diferente em comparação ao grupo infectado não desnervado (Tabela 1). Já em comparação aos camundongos C57BL/6 chagásicos, os intervalos QT e QTc dos animais Balb/c chagásicos desnervados foram significativamente maiores ($27,0\pm 3,6\text{ms}$ e $2,39\pm 0,32\text{ms}^{1/2}$, respectivamente, versus $20,9\pm 1,8\text{ms}$ e $1,81\pm 0,14\text{ms}^{1/2}$, $p<0,05$) (Tabela 1).

A infecção aguda com o *T. cruzi* nos animais C57BL/6 promoveu poucas alterações no eletrocardiograma (Tabela 1). Apenas um maior intervalo PR ($51,1\pm 5,5\text{ms}$ versus $39,3\pm 1,4\text{ms}$ no grupo C57BL/6 não infectado, $p<0,05$), indicativo de lesão no nó átrio-ventricular, foi observado. Tais resultados sugerem um grau mais leve de lesão miocárdica induzida pelo *T. cruzi* nos animais C57BL/6.

Tabela 1: Valores de parâmetros eletrocardiográficos (expressos como média±desvio padrão) de animais não infectados e infectados dos grupos C57BL/6, Balb/c não desnervado e Balb/c desnervado.

	C57BL/6 não infectado	C57BL/6 infectado	Balb/c não infectado não desnervado	Balb/c infectado não desnervado	Balb/c não infectado desnervado	Balb/c infectado desnervado
iRR (ms)	130,5±1,5	132,3±5,3	123,6±3,2	153,4±11,0*	137,3±5,5	131,8±9,4#
FC (bpm)	460,0±5,3	462,0±15,2	487,9±12,7	412,3±21,8*	443,4±19,4	470,8±27,3#
dP (ms)	17,5±0,6	14,9±1,9	12,7±0,6	18,6±2,5	12,5±0,6	14,7±0,9
iPR (ms)	39,3±1,4	51,1±5,5*	40,6±0,9	82,6±9,5*	43,3±1,0	51,1±2,3#
dQRS (ms)	11,1±0,4	11,5±0,5	11,1±0,4	12,9±0,7*	10,5±0,3	12,7±0,4*
iQaT (ms)	19,9±4,0	20,9±1,8	15,5±1,9	32,0±3,7*	24,2±2,6	27,0±3,6*#%
iQaTc (ms ^{1/2})	1,74±0,35	1,81±0,14	1,33±0,17	2,59±0,27*	2,07±0,22	2,39±0,32*#%

(iRR = intervalo RR; FC = frequência cardíaca; dP = duração da onda P; iPR = intervalo PR; dQRS = duração do complexo QRS; iQaT = duração do intervalo QT; iQaTc = intervalo QT corrigido pela equação de Bazett. ms=milsegundos; bpm= batimentos por minuto)

* p<0,05 versus respectivo grupo não infectado

p<0,05 versus grupo Balb/c infectado não desnervado

% p<0,05 versus grupo C57BL/6 infectado

5.3.2. Ecocardiograma

Ao ecocardiograma podemos observar que os animais não infectados e desnervados não apresentaram nenhuma diferença nos parâmetros funcionais mecânicos cardíacos em comparação aos animais não infectados e não desnervados (Tabela 2, Figura 8).

Por outro lado, os animais Balb/c chagásicos não desnervados na fase aguda (após 21 dias da inoculação dos parasitas) apresentaram significativa disfunção ventricular sistólica esquerda, com menor valor de fração de ejeção ventricular esquerda em comparação aos animais não infectados não desnervados ($56\pm 3\%$ versus $82\pm 3\%$, respectivamente, $p<0,05$) e significativa disfunção ventricular diastólica esquerda, com menores velocidades verticais do fluxo de enchimento rápido (E) do VE e razão E/A ($255,3\pm 25,3\text{mm/s}$ e $0,56\pm 0,13$, respectivamente, versus $601,3\pm 50,1\text{mm/s}$ e $1,67\pm 0,23$ nos animais não infectados e não desnervados, $p<0,05$) (Tabela 2, Figura 8). A disfunção sistólica foi acompanhada de um maior diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole e na diástole e também de um maior diâmetro interno do átrio esquerdo e ventrículo direito (Tabela 2, figura 8), caracterizando assim uma disfunção mecânica global do coração.

Similar aos achados eletrocardiográficos, os animais Balb/c infectados e desnervados apresentaram valores dos parâmetros ecocardiográficos significativamente melhores em comparação aos animais Balb/c chagásicos não desnervados (Tabela 2, Figura 9), com melhora na fração de ejeção ($70\pm 5\%$ versus $56\pm 3\%$ no grupo Balb/c chagásico não desnervado, $p<0,05$) e redução nos diâmetros internos do VE na diástole, do VD e do átrio esquerdo ($3,0\pm 0,3\text{mm}$, $0,9\pm 0,3\text{mm}$ e $3,0\pm 0,4\text{mm}$, respectivamente, versus $3,8\pm 0,2\text{mm}$, $1,4\pm 0,3\text{mm}$ e $3,8\pm 0,3\text{mm}$ nos animais Balb/c chagásicos não desnervados, $p<0,05$), porém ainda com disfunção diastólica.

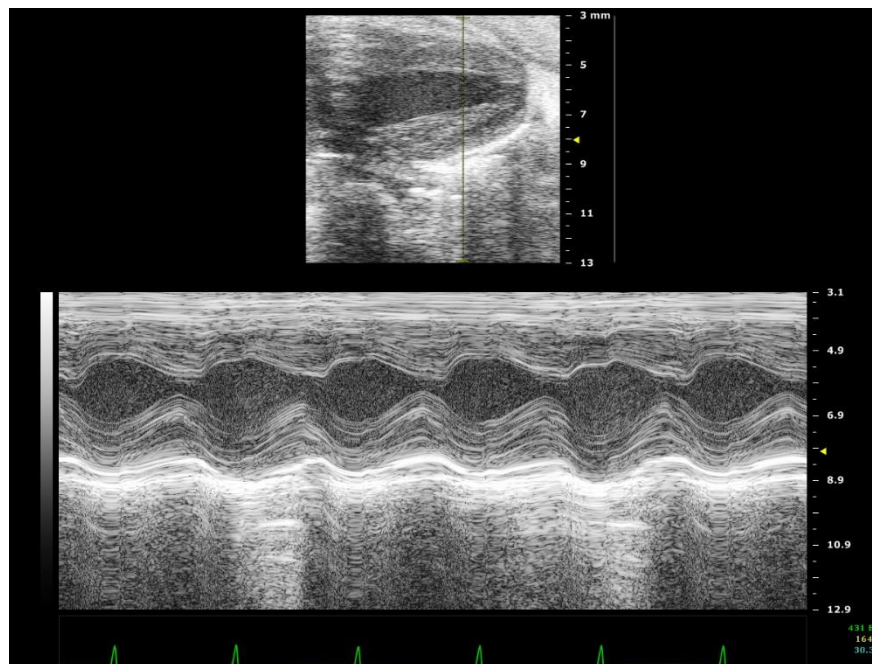
Os animais C57BL/6 chagásicos não mostraram nenhuma diferença significativa nos parâmetros ecocardiográficos de disfunção sistólica em comparação aos seus respectivos controles não infectados, ainda que se apresentassem com disfunção diastólica (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de parâmetros ecocardiográficos (expressos como média±desvio padrão) de animais não infectados e infectados com *Trypanosoma cruzi* dos grupos C57BL/6, Balb/c não desnervado e Balb/c desnervado.

	C57BL/6 não infectado	C57BL/6 infectado	Balb/c não infectado não desnervado	Balb/c infectado não desnervado	Balb/c não infectado desnervado	Balb/c infectado desnervado
DIVE, d (mm)	2,8±0,2	2,9±0,3	2,9±0,3	3,8±0,2*	2,7±0,3	3,0±0,3#
DIVE, s (mm)	1,3±0,2	1,6±0,3	1,3±0,4	1,9±0,3*	1,4±0,2	1,6±0,3
Fração de Ejeção (%)	84±1	75±3	82±3	56±3*	83±4	70±5#
DIVD (mm)	0,5±0,1	0,7±0,3	0,6±0,2	1,4±0,3*	0,6±0,3	0,9±0,3#
DIAE (mm)	2,0±0,2	2,3±0,3	2,2±0,3	3,8±0,3*	2,0±0,3	3,0±0,4*#%
VVE (mm/s)	581,5±67,2	232,5±25,9*	601,3±50,1	255,3±25,3*	554±38,2	245,3±28,1*
Desacel E (m/s ²)	-36,2±8,7	-12,1±3,7	-35,2±7,2	-13,4±3,5	-34,9±4,8	-14,2±3,3
Tempo desacel E (ms)	18,1±3,2	17,0±2,7	17,9±4,2	16,2±2,4	17,2±5,3	16,9±2,9
VVA (mm/s)	370,1±52,3	442,5±29,2	360,3±45,7	456,1±32,1	347,6±38,1	471,2±42,7
Razão E/A	1,57±0,23	0,52±0,21*	1,67±0,23	0,56±0,13*	1,60±0,17	0,53±0,18*

(DIVE = Diâmetro interno do ventrículo esquerdo; DIAE = Diâmetro interno do átrio esquerdo; DIVD = Diâmetro interno do ventrículo direito; d = diástole; s = sístole; mm = milímetro; VVE = Velocidade vertical do fluxo de enchimento rápido (E) do VE; Desacel E = Desaceleração da fase E do VE; VVA = Velocidade vertical do fluxo de contração atrial (A) do VE; E/A: razão entre VVA e VVE). * p<0,05 versus respectivo grupo não infectado; # p<0,05 versus grupo Balb/c infectado não desnervado; % p<0,05 versus grupo C57BL/6 infectado

(A)



(B)

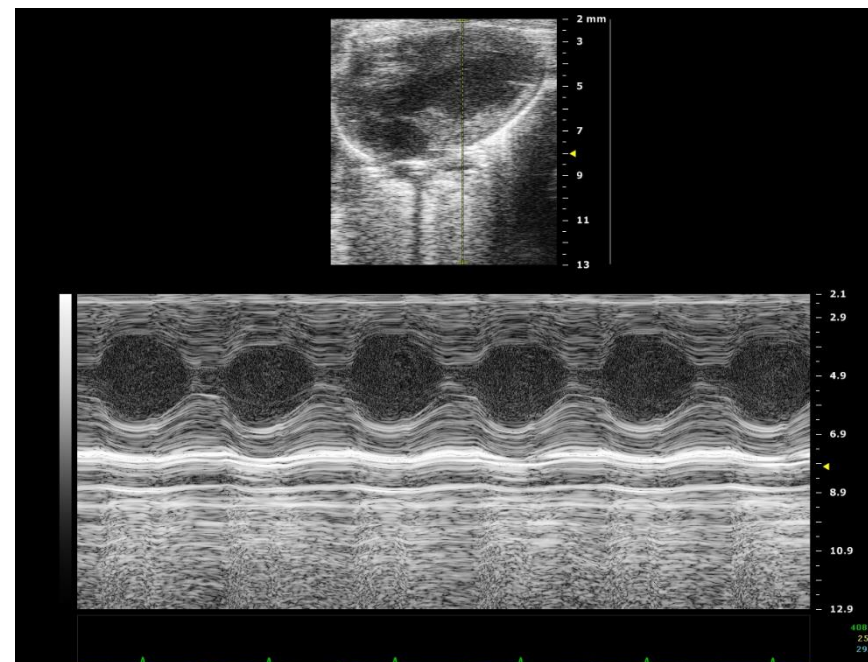
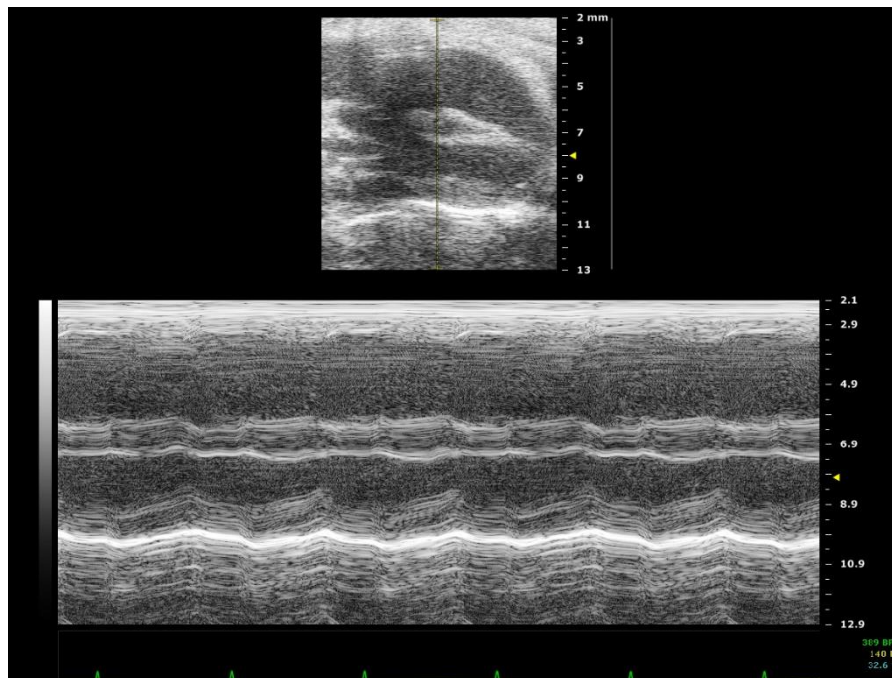
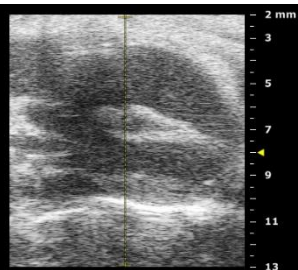


Figura 8: Imagens ecocardiográficas em modo bi-dimensional (painéis superiores) e em modo M (painéis inferiores) representativas de um animal Balb/c não infectado não desnervado (A) e de um animal Balb/c não infectado desnervado (B). Note a similaridade nos diâmetros internos do ventrículo esquerdo em ambos os animais, os quais não apresentam dilatação cardíaca.

(A)



(B)

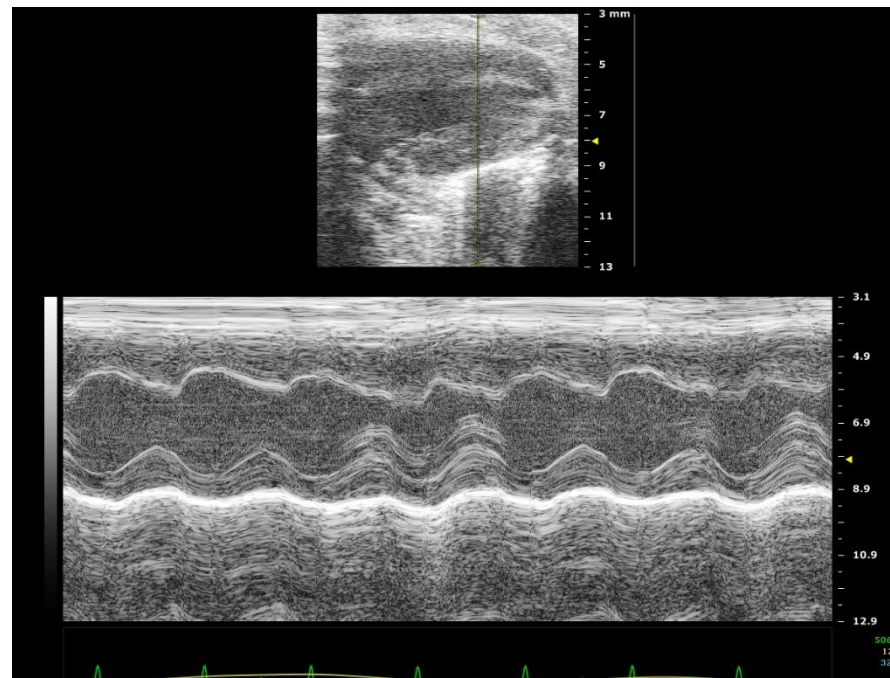
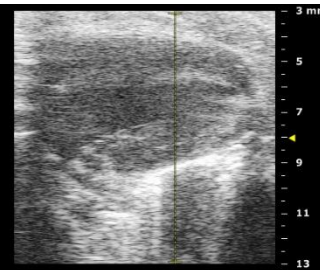


Figura 9: Imagens ecocardiográficas em modo bi-dimensional (painéis superiores) e em modo M (painéis inferiores) representativas de um animal Balb/c infectado não desnervado (A) e de um animal Balb/c infectado desnervado (B). Note o grande diâmetro interno dos ventrículos direito e esquerdo no animal infectado não desnervado (A) e o menor diâmetro do ventrículo direito no animal infectado desnervado.

5.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA CARDÍACA

O estudo histológico do coração de animais não infectados revelou que a desnervação de fibras nervosas tipo C não promoveu nenhuma alteração na arquitetura histológica do coração (Figura 10), corroborando os achados eletro- e ecocardiográficos, os quais também não evidenciaram nenhuma alteração funcional elétrica ou mecânica.

Por outro lado, nos animais Balb/c infectados e não desnervados, uma intensa e difusa miocardite aguda foi verificada, acometendo todas as regiões do coração, com grande intensidade nos átrios e ventrículo direito (Figura 11), conforme denota a pontuação atribuída para cada região (Tabela 3). Além da intensa inflamação, pode-se também notar a presença de miócitos em franca degeneração e a marcante e difusa distribuição de ninhos de amastigotas, por todo o tecido miocárdio (Figura 12).

A infecção aguda nos animais Balb/c desnervados mostrou uma significativa redução no infiltrado inflamatório ventricular direito e esquerdo pontuação 2(0,5) e 1(1), respectivamente, versus 3(1) e 2(1) nos animais Balb/c infectados não desnervados, $p < 0,05$, ainda que com a permanência de uma infiltração inflamatória de moderada intensidade no ventrículo direito e de leve intensidade no ventrículo esquerdo (Tabela 3, Figura 11). Apesar da melhora na infiltração inflamatória nos ventrículos, nenhuma melhora foi observada na infiltração inflamatória dos átrios nos animais Balb/c desnervados (Tabela 3, Figura 11). Na pontuação global da inflamação, os animais Balb/c chagásicos desnervados mostraram uma pontuação significativamente menor que os animais Balb/c chagásicos não desnervados, respectivamente 6(0,5) versus 8(0,75) ($p < 0,05$). Em comparação ao grupo C57BL/6 infectado, a infiltração inflamatória em ventrículos foi similar. Porém, nos átrios, o infiltrado inflamatório foi significativamente maior, 3(0) versus 2(1) nos animais C57BL/6 chagásicos ($p < 0,05$).

Já a infecção aguda nos animais C57BL/6 promoveu um quadro menos intenso de miocardite difusa (Tabela 3, Figura 11).

A contagem de ninhos de amastigotas revelou que a desnervação de fibras C promove uma significativa redução do parasitismo tecidual, sendo 30 (34,75) ninhos/10 campos versus 60,5 (48) ninhos/10 campos no grupo Balb/c chagásico não desnervado ($p < 0,05$) (Figura 12). Esta contagem, porém, foi significativamente maior nos animais Balb/c chagásico desnervado que a observada nos animais C57BL/6 chagásicos, 30 (34,75) ninhos/10 campos versus 13 (20,25) ninhos/10 campos, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 12).

Tabela 3: Valores de “score” inflamatório expressos como mediana (intervalo interquartil) de átrio, ventrículo direito e ventrículo esquerdo de animais infectados dos grupos C57BL/6, Balb/c não desnervado e Balb/c desnervado.

	C57BL/6 infectado	Balb/c infectado não desnervado	Balb/c infectado desnervado
Miocardite atrial	2(1)*	3(0,5)	3(0)#
Miocardite ventricular direita	2 (0,5)*	3(1)	2(0,5)*
Miocardite ventricular esquerda	1 (0,25)*	2(1)	1 (1)*
“Score” inflamatório total	5 (1,25)*	8 (0,75)	6(0,5)*

(“Score” 1 = inflamação leve; “score” 2 = inflamação moderada; “score” 3 = inflamação intensa; “score” total = somatória dos “scores” das três regiões estudadas).

* $p < 0,05$ versus grupo Balb/c infectado não desnervado;

$p < 0,05$ versus grupo C57BL/6 infectado

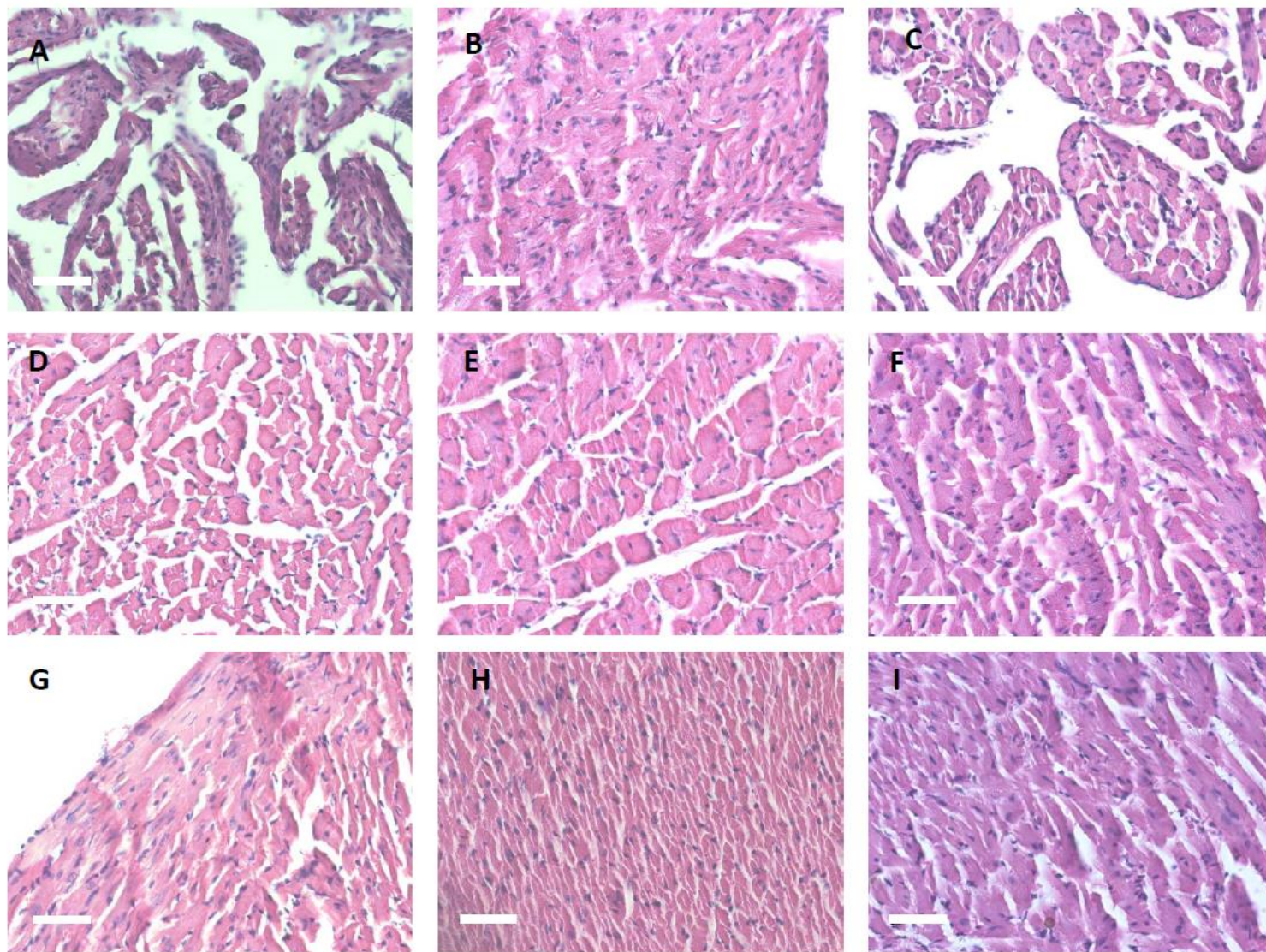


Figura 10: Fotomicrografias de luz de tecidos atriais (painéis A, B e C), ventriculares direitos (painéis D, E e F) e ventriculares esquerdos (G, H e I) de animais representativos dos grupos Balb/c não infectado não desnervado (painéis A, D e G), Balb/c não infectados desnervado (painéis B, E e H) e C57BL/6 não infectado (painéis C, F e I). Barra de escala = 30 μ m.

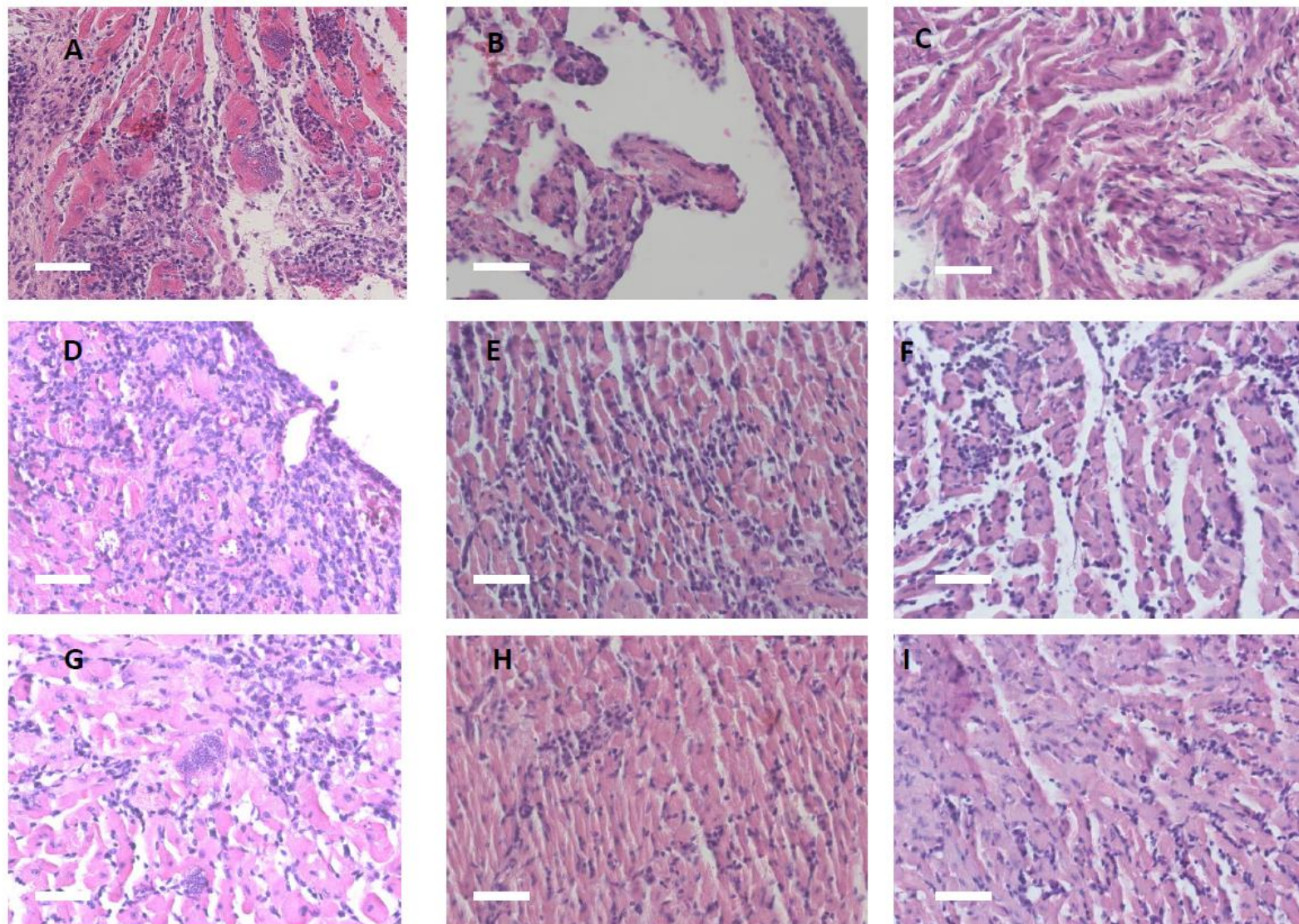


Figura11: Fotomicrografias de luz de tecidos atriais (painéis A, B e C), ventriculares direitos (painéis D, E e F) e ventriculares esquerdos (painéis G, H e I) de animais representativos dos grupos Balb/c infectado não desnervado (painéis A, D e G), Balb/c infectados desnervado (painéis B, E e H) e C57BL/6 infectado (painéis C, F e I). Note que o infiltrado inflamatório foi intenso nos átrios (A) e ventrículo direito (D) e moderado no ventrículo esquerdo (E) do animal Balb/c infectado não desnervado. Note ainda uma redução na infiltração inflamatória nos ventrículos (painéis E e H) do animal Balb/c chagásico desnervado, a qual ficou similar à observada no animal C57BL/6 chagásico (Painel E e F). Barra de escala = 30 μ m.

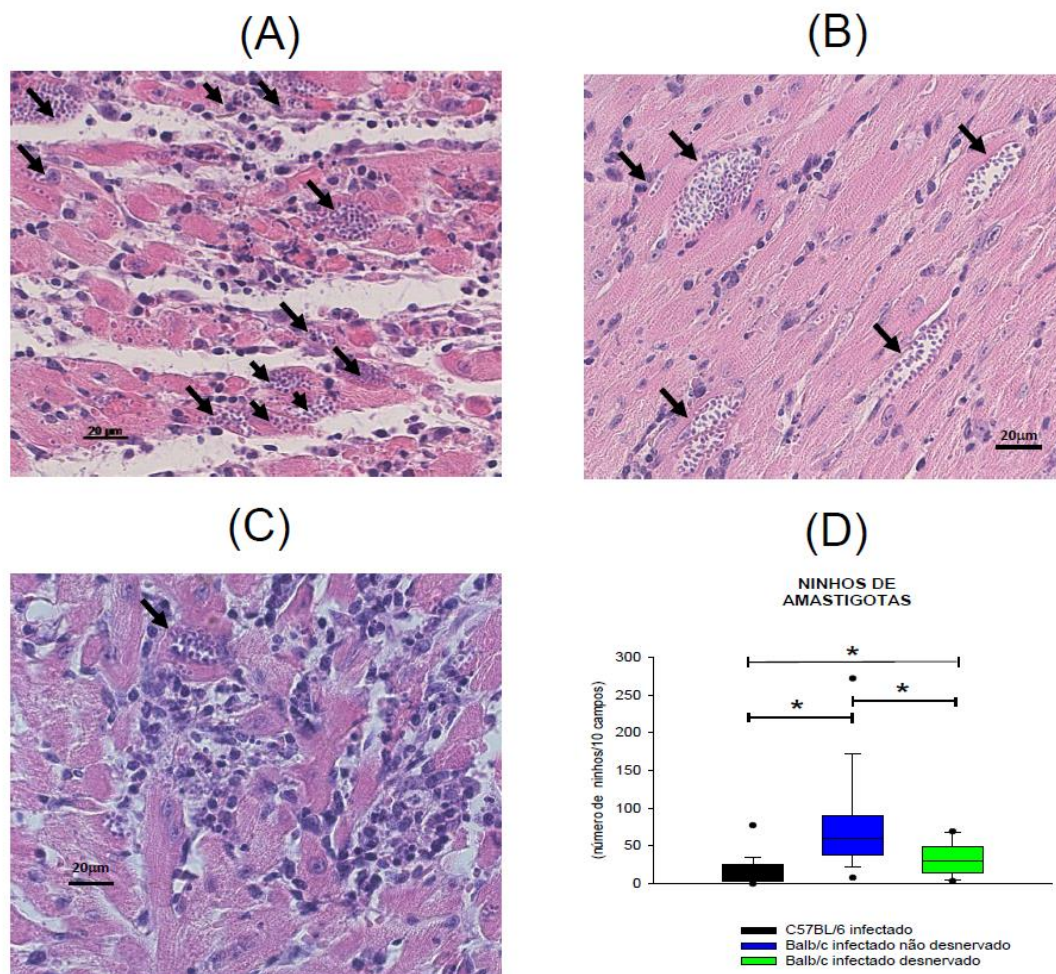


Figura 12: Fotomicrografias de luz de tecidos ventriculares de Balb/c infectado não desnervado (painel A), Balb/c infectado desnervado (painel B) e C57BL/6 infectado (painel C), mostrando os ninhos de amastigotas (setas). Note a intensa infecção nos animais Balb/c infectados não desnervados. (painel D): gráfico de barras mostrando os valores medianos da contagem numérica de ninhos nos três grupos estudados. Barra de escala = 20 μ m.

5.6. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

5.6.1. Fenotipagem de células do baço

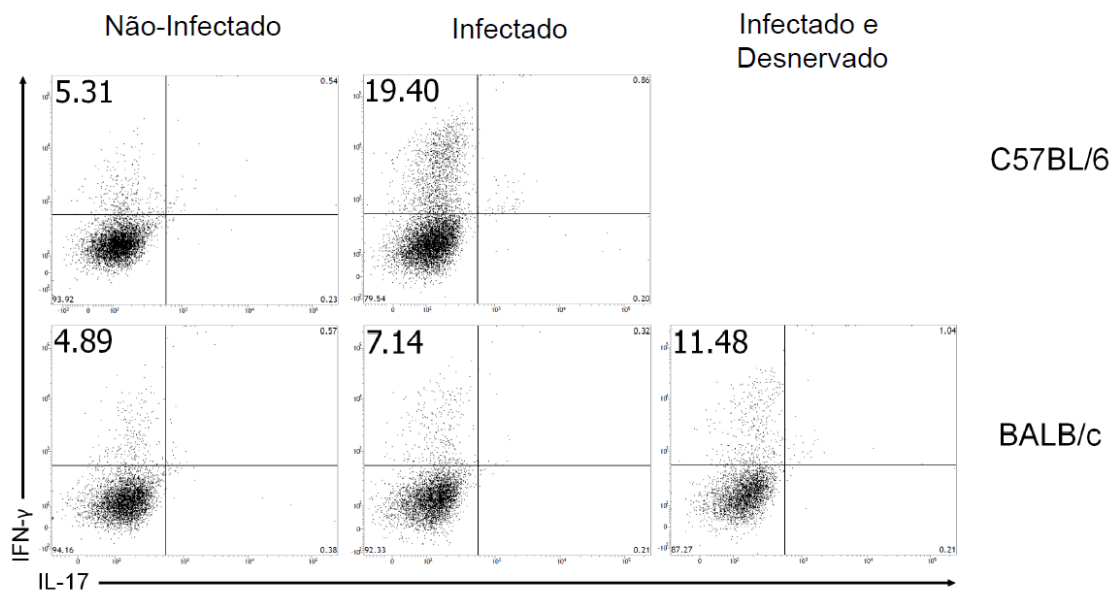
Verificou-se que as células mononucleares CD4+IFN γ + (células Th1) encontram-se em maior número ($p < 0,001$) em todos os animais infectados pelo *T. cruzi*, em relação aos respectivos controles não infectados (Figura 13). Porém, a contagem percentual observada nos camundongos Balb/c infectados e não desnervados ($10,3 \pm 1,9\%$) foi significativamente menor que a contagem observada no baço dos animais C57BL/6 infectados ($23,2 \pm 3,3\%$, $p < 0,01$) (Figura 13). Após 21 dias do procedimento de desnervação pela capsaicina, o número percentual de células Th1 no baço dos animais Balb/c infectados e desnervados ($22,3 \pm 3,5\%$) foi significativamente maior que a contagem observada no baço dos animais Balb/c infectados e não desnervados ($10,3 \pm 1,9\%$, $p < 0,01$), sem haver entretanto diferença significativamente em comparação aos camundongos C57BL/6 infectados ($23,2 \pm 3,3\%$, $p = \text{não significativo}$) (Figura 13).

Por outro lado, células mononucleares do baço CD4+Foxp3+ (células T reguladoras) foram observadas em menor número ($p < 0,001$) em todos os animais infectados pelo *T. cruzi* em comparação aos respectivos controles não infectados (Figura 14). Porém, as contagens percentuais observada nos camundongos Balb/c infectados e não desnervados e nos infectados e desnervados ($5,8 \pm 1,0\%$ e $4,5 \pm 0,4\%$, respectivamente) foram significativamente maiores que a contagem observada no baço dos animais C57BL/6 infectados ($3,2 \pm 0,3\%$, $p < 0,01$) (Figura 14).

As células CD4+IL-13+ (células Th2) foram significativamente mais numerosas em todos os animais infectados ($p < 0,001$) em comparação aos respectivos controles não infectados (Figura 15). Porém, entre os animais infectados, nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 15).

De forma similar, os números percentuais de células mononucleares CD4+IL-17+ (células Th17) do baço dos animais infectados foram significativamente maiores ($p < 0,001$) que os observados nos respectivos animais não infectados (Figura 16). Entre os animais chagásicos, o grupo C57BL/6 infectado apresentou um número significativamente maior ($35,4 \pm 4,6\%$) em comparação aos camundongos Balb/c chagásicos não desnervados e desnervados ($17,4 \pm 1,1\%$ e $17,5 \pm 1,2\%$, respectivamente, $p < 0,01$ para ambas as comparações) (Figura 16).

(A)



(B)

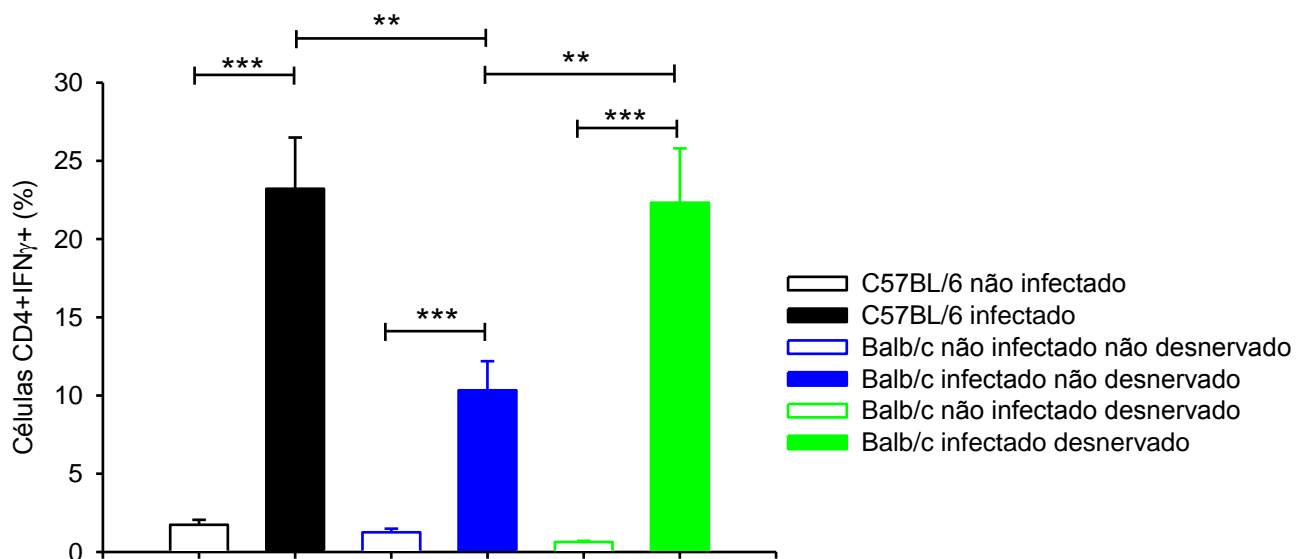
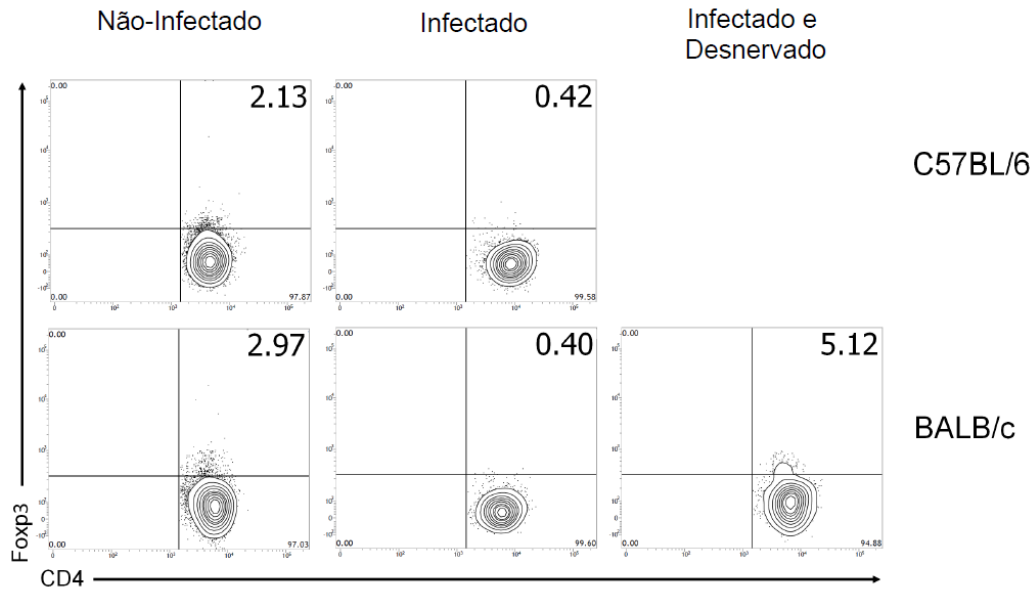


Figura 13: Citometria de fluxo de células mononucleares Th1 (CD4+IFN γ +) do baço. (A) Gráficos de eventos pontuais quantificados representativos de cada grupo estudado. (B) Valores percentuais médios (\pm erro padrão) de células mononucleares Th1 (CD4+IFN γ +) do baço de cada grupo estudado. (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

(A)



(B)

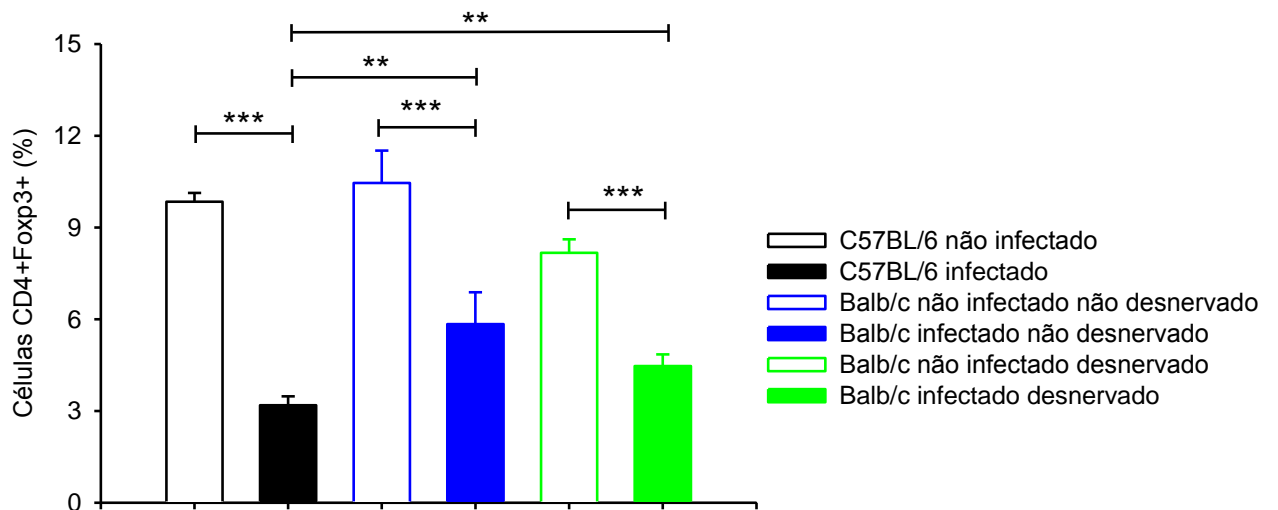


Figura 14: Citometria de fluxo de células mononucleares T reguladoras (CD4+Fcpx3+) do baço. (A) Gráficos de contorno de densidade de eventos quantificados representativos de cada grupo estudado. (B) Valores percentuais médios (\pm erro padrão) de células mononucleares T reguladoras (CD4+Fcpx3+) do baço de cada grupo estudado. (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$)

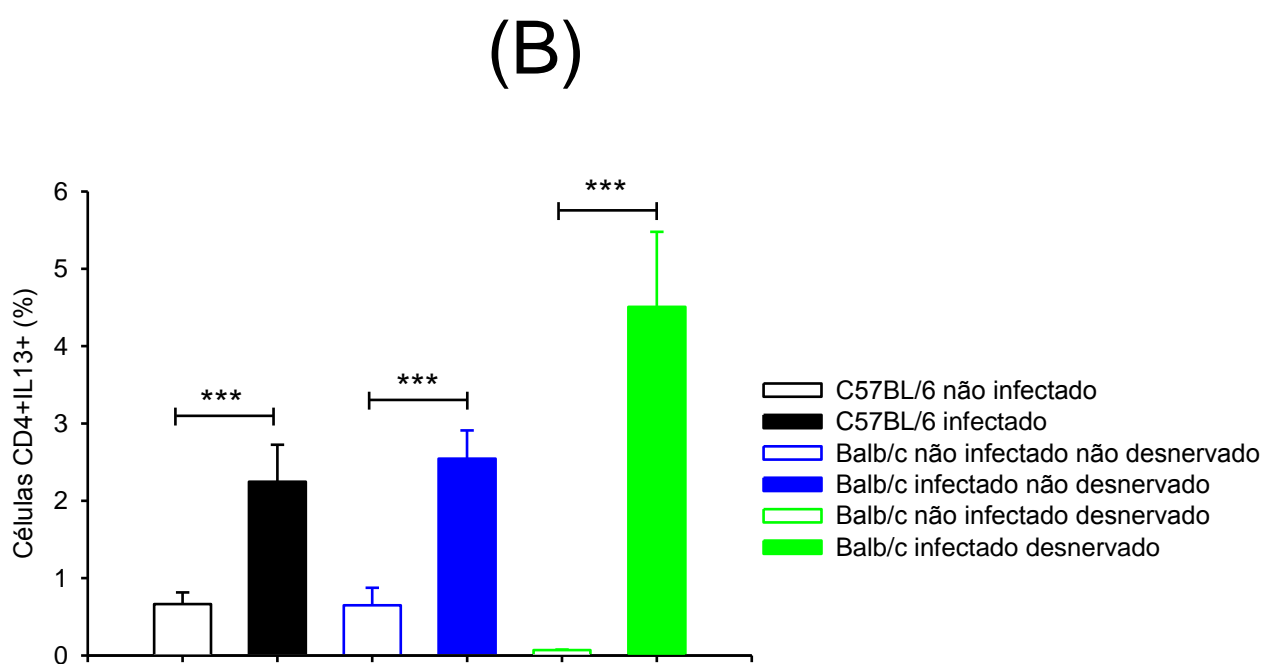
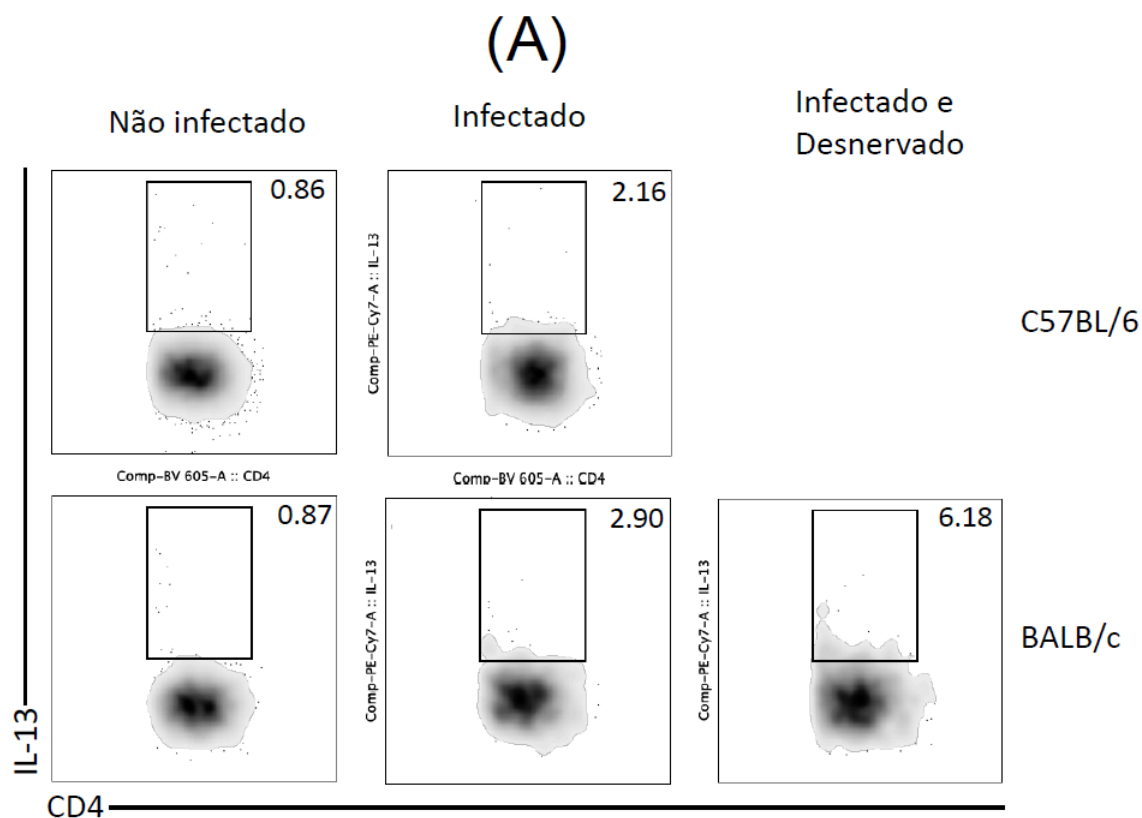


Figura 15: Citometria de fluxo de células mononucleares Th2 (CD4+IL-13+) do baço. (A) Gráficos de contorno de densidade de eventos quantificados representativos de cada grupo estudado. (B) Valores percentuais médios (\pm erro padrão) de células mononucleares Th2 (CD4+IL-13+) do baço de cada grupo estudado. (***) $p < 0,001$.

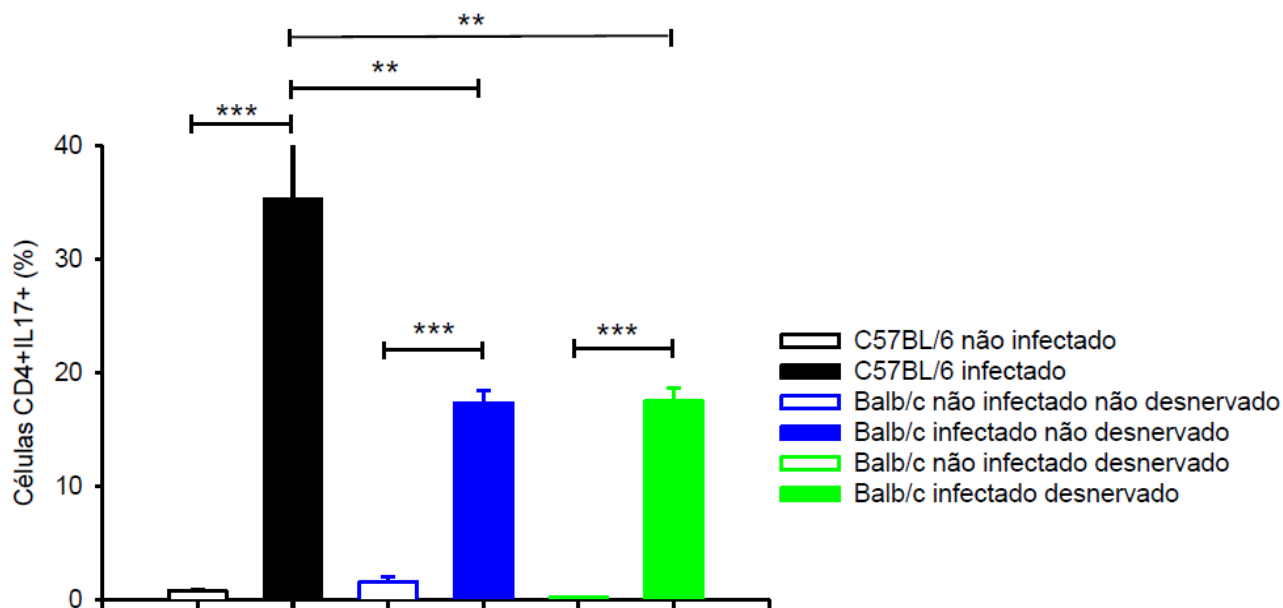


Figura 16: Citometria de fluxo de células mononucleares Th17 (CD4+IL-17+) do baço. Valores percentuais médios (\pm erro padrão) de células mononucleares Th7 (CD+IL-17+) do baço de cada grupo estudado. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5.6.2. Citocinas e quimiocinas séricas

Ainda no contexto da avaliação da resposta imune, dosagens das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 e da quimiocina MCP-1 no soro foram realizadas por meio de citometria de fluxo via painel de “beads” citométricas (CBA, Cytometric Bead Array).

Como mostrado na figura 17, os níveis séricos das quatro citocinas pró-inflamatórias e da quimiocina MCP-1 não foram diferentes entre os grupos de animais não infectados.

Por outro lado, os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , e IFN- γ e da quimiocina MCP-1 foram elevados nos três grupos de animais chagásicos, em comparação com os respectivos grupos não infectados ($P < 0,001$). Em adição, excetuando os animais C57BL/6, a infecção pelo *T. cruzi* também elevou os níveis séricos de IL-6 nos animais Balb/c infectados desnervados ou não desnervados (Figura 17). Na comparação entre os três grupos de animais infectados, pode-se ainda notar que os níveis séricos de TNF- α foram significativamente maiores nos animais C57BL/6

infectados ($192,6 \pm 14,6 \text{ ng/dL}$) em comparação aos animais Balb/c infectados não desnervados e desnervados ($132,0 \pm 12,7 \text{ ng/dL}$ e $109,5 \pm 9,6 \text{ ng/dL}$, respectivamente, $p < 0,01$ para ambas as comparações). As citocinas $\text{IFN-}\gamma$ e IL-6 e a quimiocina MCP-1 não foram diferentes entre os três grupos de animais infectados (Figura 17).

Em relação à citocina do perfil Th2, IL-10 , nenhuma diferença foi encontrada nos diversos grupos estudados (Figura 17).

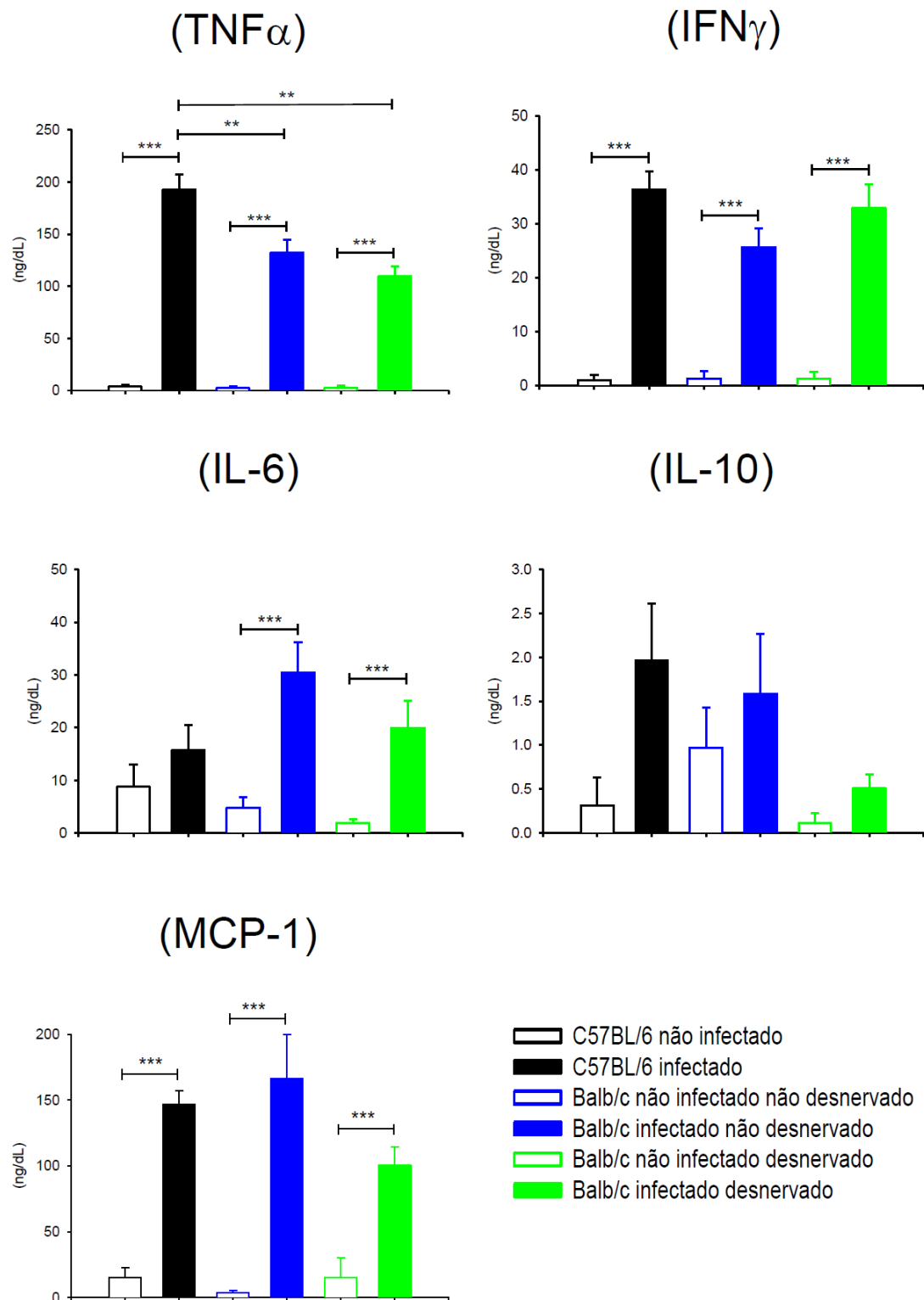


Figura 17: Níveis séricos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e da quimiocina MCP-1 nos grupos experimentais Balb/c e C57BL/6 não infectados e infectados e não desnervados e desnervados. (**p<0,01, ***p<0,001).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos da desnervação sensorial de fibras nervosas do tipo C, induzida pela capsaicina sobre o comportamento da doença de Chagas aguda em camundongos da linhagem Balb/c, reconhecidamente susceptíveis à doença, causada pelo *T. cruzi*, cepa Colombiana. A desnervação de fibras C no camundongo levou a uma significativa melhora funcional elétrica e mecânica do coração, a qual foi acompanhada por significativa melhora na infiltração inflamatória e no parasitismo miocárdico. Tais melhoras fizeram o quadro chagásico agudo se assemelhar ao observado em animais da linhagem C57BL/6, a qual reconhecidamente desenvolve um quadro de miocardite chagásica aguda menos intensa. A melhora do quadro miocárdico foi também acompanhada por redução significativa do nível de parasitemia e melhora no perfil de resposta imunecelular do tipo Th1 em células mononucleares do baço. Tais achado indicam fortemente a participação de fibras sensoriais periféricas do tipo C na mediação da resposta imune-celular ao *T. cruzi* durante o curso evolutivo de fase aguda da doença de Chagas experimental em camundongos. Estudos adicionais são necessários para elucidar se esta participação de fibras sensoriais tipo C é mediada pela liberação local de neurocininas pró-inflamatórias (substância P, CGRP, neurocinina 1, neurocinina 2) ou por uma alça reflexa central anti-inflamatória mediada pelo nervo vago. Tais achados podem ter importantes implicações para a compreensão da fisiopatogenia da doença de Chagas pela inclusão de mais um novo fator mediador, as fibras sensoriais do tipo C, nas complexas interações parasito-hospedeiro observadas no curso natural da doença de Chagas.

A caracterização da doença de Chagas no camundongo, empregando o eletrocardiograma e o ecocardiograma como avaliação funcional e a avaliação histológica do infiltrado inflamatório e do parasitismo tecidual revelou que o modelo de inoculação da cepa Colombiana do *T. cruzi* em camundongo das linhagens Balb/c e C57BL/6 foi efetivo no desenvolvimento da fase aguda da doença.

O eletrocardiograma dos animais Balb/c chagásicos não desnervados evidenciou um aumento da duração do intervalo PR e do complexo QRS, associado à elevação do intervalo QT absoluto e corrigido pelo intervalo RR (pela fórmula de Bazett) aos 21 dias da inoculação. Tais achados são concordantes com vários relatos da literatura em camundongos (POSTAN et al., 1987; GOBBI et al., 2007; 2010; EICKHOFF et al., 2010; MACHADO et al., 2012; STRAUSS et al., 2013; DALIRY et al., 2014) e indicam lesão do nó átrio-ventricular, prolongando o intervalo PR, no sistema de condução intra-ventricular (His-Purkinje), alongando o complexo QRS e alterações na

repolarização ventricular (aumento do intervalo QT) decorrentes de inflamação e/ou isquemia e/ou hipertrofia, etc. presentes no miocárdio ventricular agudamente danificado. O eletrocardiograma dos animais C57BL/6 chagásicos revelou um quadro eletrocardiográfico mais leve, com acometimento significativo apenas do intervalo PR e sem o significativo aumento da duração do complexo QRS e do intervalo QT. Tais achados vão em concordância aos encontrados por Eickhoff et al. (2010), os quais mostraram menor dano funcional elétrico do coração nos animais da linhagem C57BL/6 com diferentes cepas de *T. cruzi*. Estes achados eletrocardiográficos reforçam a constatação prévia de maior resistência à infecção demonstrada pela linhagem C57BL/6 (TRISCHMANN, 1986). Curiosamente, nos animais Balb/c chagásicos desnervados pela capsaicina, o eletrocardiograma apresentou uma melhora significativa, se assemelhando ao ECG dos animais chagásicos da linhagem C57BL/6. Não foi encontrado na literatura qualquer menção à melhora eletrocardiográfica da doença de Chagas após desnervação de fibras sensoriais do tipo C.

Os achados eletrocardiográficos foram associados à presença de disfunção tanto sistólica (queda da fração de ejeção) quanto diastólica (queda da razão E/A) do ventrículo esquerdo nos animais Balb/c com infecção na fase aguda, reforçando a idéia de um quadro de miocardite ventricular importante comprometendo também a função mecânica da musculatura. Estes achados são similares aos encontrados em pacientes com miocardite chagásica aguda (FERREIRA & MIZIARA, 1985; PARADA et al., 1997; FUENMAYOR et al., 2005; PINTO et al., 2008), bem como em diferentes linhagens de camundongos infectados durante a fase aguda por diferentes cepas de *T. cruzi* (CHANDRA et al, 2002; PRADO et al., 2009; JELICKS & TANOWITZ, 2011; ESPER et al., 2012). Curiosamente, uma dimensão aumentada do ventrículo direito também foi observada, resultado este que se assemelha a outros encontrados tanto em humanos (MOREIRA et al., 2017), quanto em modelos murinos da doença (SOUZA et al., 2005; GOLDENBERG et al., 2008; JASMIN et al., 2014).

O ecocardiograma dos animais C57BL/6 chagásicos revelou alterações apenas na função diastólica do ventrículo esquerdo, sugerindo um acometimento miocárdico ventricular esquerdo menos intenso. É provável que a disfunção mecânica menos intensa (apenas acometimento da função diastólica de VE) observada na linhagem C57BL/6 possa ser decorrente do perfil de resistência ao parasita (TRISCHMANN, 1986).

À semelhança do ECG, a doença de Chagas aguda nos animais Balb/c

desnervados apresentou alterações mecânicas cardíacas mais leves, acometendo também e tão somente a função diastólica do VE. Este achado fortemente sugere uma eventual participação das fibras sensoriais do tipo C na mediação da depressão ventricular contrátil observada nos animais chagásicos da linhagem Balb/c. Novamente nada foi encontrado na literatura sobre um eventual efeito de fibras C sobre a mecânica cardíaca alterada na doença de Chagas.

Os achados eletro- e ecocardiográficos foram associados a alterações correlatas no perfil histológico do miocárdio. Na linhagem Balb/c chagásica não desnervada, um intenso infiltrado inflamatório miocárdico, com elevada degeneração miocelular e parasitismo tecidual marcado foi observado. Por outro lado, nos animais da linhagem C57BL/6, o perfil histológico foi bem menos marcante, com pouco infiltrado inflamatório e raros ninhos de amastigotas encontrados. Tais achados concordam com os de outros autores (TRISCHAMANN, 1986; EICKHOOF et al, 2010) e parecem estar correlacionados ao perfil de resistência imune maior mostrado pelos animais da linhagem C57BL/6.

À semelhança dos achados eletro- e ecocardiográficos, uma melhora no perfil inflamatório tecidual foi observado nos corações dos animais Balb/c desnervados, tornando os corações mais similares aos observados nos animais da linhagem C57BL/6 infectada. Tais achados histológicos sugerem fortemente uma participação das fibras sensoriais do tipo C na mediação do quadro inflamatório miocárdico observado nos camundongos chagásicos da linhagem Balb/c. Novamente, nada de similar na literatura foi encontrado relativo a estes achados.

Os valores de parasitemia apresentados no presente estudo mostram um processo de proliferação do parasito e circulação sistêmica do mesmo bastante intenso nos camundongos da linhagem Balb/c, atingindo contagens muito elevadas após três semanas da infecção (cerca de 6×10^5 parasitas por mL de sangue circulante). Tais achados foram observados por outros autores previamente (MORALES et al., 1987; CABEZA MECKERT et al., 1988; MOTRAN et al., 1998; ROCHA et al., 2006). Os animais infectados da linhagem C57BL/6, porém, não apresentaram níveis tão elevados de parasitas circulantes, mais uma vez demonstrando a grande resistência desta linhagem à infecção pelo *T. cruzi* (TRISCHMANN, 1986). O nível de parasitemia nos animais chagásicos Balb/c previamente desnervados com a capsaicina foram muito menores em comparação aos camundongo de mesma linhagem não desnervados e próximos aos dos animais da linhagem C57BL/6. Mais uma vez, estes achados reforçam

a idéia de que a desnervação de fibra sensoriais do tipo C, de alguma forma, modula a resposta imune do hospedeiro, aumentando a eliminação do parasita, não só localmente no tecido, como acima descrito para o coração, como também sistemicamente em nível da circulação sanguínea.

Na tentativa de melhor entender nossos achados funcionais e histopatológicos, partimos para a caracterização da resposta imune-celular em nossos animais experimentais. Levando-se em consideração que o baço é um órgão linfóide secundário que aloja uma variedade de células imunes, tais como linfócitos T e B e células apresentadoras de antígenos importantes para o desenvolvimento da resposta imune na doença de Chagas (MAIOLI et al., 2011), decidimos avaliar o perfil fenotípico de células mononucleares do baço nos diferentes grupos experimentais estudados. Em adição, o perfil sérico de algumas citocinas e quimiocinas foi também investigado. As células imunes do baço de animais chagásicos da linhagem Balb/c não desnervados apresentaram uma elevação do perfil Th1 pró-inflamatório e Th17 e uma significativa redução de células T regulatórias. Este perfil foi associado a elevação nos níveis séricos de TNF α , IFN γ , IL-6 e MCP-1, caracterizando uma resposta pró-inflamatória montada frente ao parasita, tanto circulante quanto nos tecidos corporais, em especial o miocárdico aqui estudado. Este padrão de resposta tem sido observado por outros autores, empregando a mesma linhagem de camundongo (CARDONI et al., 1999).

Por outro lado, nos animais chagásicos C57BL/6 que se apresentaram com menor intensidade de lesão tecidual cardíaca e menor parasitismo tecidual e sanguíneo, um perfil de resposta imune celular no baço também Th1 foi observado, porém num nível muito mais intenso (cerca de 2x mais células Th1 CD4+IFN γ +) que os animais chagásicos Balb/c não desnervados. Este maior contingente de células Th1 foi acompanhado de elevados níveis séricos de IFN γ , MCP-1 e principalmente TNF α , o qual foi significativamente maior nos animais chagásicos C57BL/6 em comparação aos animais chagásicos Balb/c não desnervados. As células Th2 sofreram aumento nos animais infectados, sem, porém, diferirem no perfil de elevação. Similar aos animais Balb/c não desnervados, uma redução significativa na resposta de células T reguladoras também foi observada, sendo esta redução, no entanto mais intensa nos animais C57BL/6. Ao mesmo tempo, diferente dos animais Balb/c chagásicos, a IL-6 não sofreu modificação nos animais C57BL/6 chagásico. Um perfil intenso de células Th1 no baço de animais C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* tem sido demonstrado por outros autores (MICHAILOWISKY et al., 2001) e explica a elevada resistência destes camundongos à

infecção pelo *T. cruzi*. Curiosamente, a desnervação de fibras sensoriais do tipo C pela capsaicina eleva o número de células esplênicas Th1 (células CD4+IFN γ +) dos animais Balb/c chagásicos não desnervados, o qual foi associado a um perfil de maior resistência à infecção (resistência, esta caracterizada pela menor disfunção elétrica e mecânica do coração, menor infiltração inflamatória miocárdica e menor parasitismo tecidual e sanguíneo). Novamente, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que mostra no contexto da doença de Chagas, o papel de fibras sensoriais do tipo C na modulação do perfil da resposta imune ao parasita.

Os possíveis mecanismos pelos quais as fibras sensoriais do tipo C mediam a resposta imune à infecção chagásica aguda não foram exploradas na presente investigação. Porém, a título de especulação, e baseado em dados experimentais prévios de outros estudos em outros contextos imunopatológicos, podemos considerar alguns possíveis mecanismos. Primeiramente, como já é de notório conhecimento, as terminações livres das fibras sensoriais do tipo C possuem vesículas sinápticas armazenadoras de neuropeptídeos (Substância P, CGRP, neurocinina A/B), os quais quando liberados na injúria tecidual podem levar à ativação de células imunes locais e potencializar a resposta inflamatória tecidual (MCDONALD et al., 1996). Uma eventual participação destas neurocininas periféricas na exacerbada resposta inflamatória cardíaca observada nos animais Balb/c chagásicos poderia ser especulada, já que a prévia destruição destas terminações do tipo C pela capsaicina, impedindo assim a liberação das neurocininas, levaria certamente a uma redução da resposta inflamatória. Porém, a nosso ver, tal possível mecanismo periférico cardíaco não explicaria a redução do parasitismo tecidual e mesmo sanguíneo após a desnervação. Em adição, como o efeito da capsaicina é sistêmica, esta mesma desnervação e redução local de neurocininas, ocorrendo no baço, levaria a uma menor ativação da resposta Th1 no baço. E o verificado em nossos experimentos foi exatamente o contrário, a desnervação exagera a contagem de células Th1 no baço. Assim sendo, outro possível mecanismo deve estar envolvido.

Em nossa opinião, tal mecanismo deve envolver o reflexo anti-inflamatório vagal descrito primeiramente por Borovkova et al. em 2000. A ativação de fibras aferentes sensoriais do tipo C vagais abdominais ou torácicas poderia levar reflexamente à ativação da via anti-inflamatória colinérgica, a qual tem grande impacto sobre a função de células imunes no baço (TRACEY, 2009). Uma maior participação desta via em camundongos susceptíveis como os da linhagem Balb/c poderia explicar a

baixa resposta Th1 nestes animais e, portanto, a pequena eliminação dos parasitas pelas células imunes, explicando assim o elevado parasitismo sanguíneo e tecidual. E um maior parasitismo cardíaco poderia explicar a intensa resposta inflamatória cardíaca, apesar da via reflexa colinérgica anti-inflamatória poder estar atuando no próprio coração. Com a desnervação das fibras C pela capsaicina, tal via poderia ser atenuada e seus efeitos anti-inflamatórios, anti-Th1 no baço seriam perdidos, aumentando a capacidade das células imunes esplênicas de eliminarem parasitas e assim reduzirem o parasitismo sanguíneo e tecidual observados em nosso estudo, com a consequente redução da miocardite e disfunção cardíaca. Um reforço a esta idéia vem de dados relativamente recentes por Daliry et al. em 2014, os quais demonstraram que camundongos chagásicos susceptíveis à infecção chagásica, da linhagem C3H/HeH3, possuem modulação vagal cardíaca inalterada, enquanto camundongos chagásicos C57BL/6 resistentes à infecção apresentaram marcada redução da modulação vagal cardíaca, avaliada por meio de análise da variabilidade da frequência cardíaca (DALIRY et al., 2014). Em outras palavras, a desnervação de fibras C nos animais Balb/c susceptíveis com alta atividade vagal eferente, ao levar à inibição vagal eferente, poderia exacerbar a resposta Th1 no baço e melhorar a eliminação de parasitas e, em consequência, a miocardite chagásica. Já nos camundongos C57BL/6 chagásicos, a ausência de base desta modulação vagal eferente no baço, poderia explicar sua enorme resposta Th1 e o menor parasitismo e a menor inflamação observadas. Porém, para que esta explicação seja confirmada, novos experimentos necessitam ser executados em um futuro próximo.

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez em camundongos chagásicos da linhagem Balb/c, que a desnervação sensorial de fibras nervosas do tipo C, induzida pela capsaicina levou a uma significativa melhora funcional elétrica e mecânica do coração, a qual foi acompanhada por significativa melhora na infiltração inflamatória e no parasitismo circulante e miocárdico. Tais melhoras fizeram o quadro chagásico agudo se assemelhar ao observado em animais da linhagem C57BL/6, a qual reconhecidamente resistente à doença. A melhora do quadro miocárdico foi acompanhada por redução significativa do nível de parasitemia e melhora no perfil de resposta imunecelular do tipo Th1 em células mononucleares do baço. Tais achados indicam fortemente a participação de fibras sensoriais periféricas do tipo C na mediação da resposta imune-celular ao *Trypanosoma cruzi* durante o curso evolutivo de fase aguda da doença de Chagas experimental em camundongos. Estudos adicionais são necessários para elucidar uma possível participação da alça reflexa central anti-inflamatória mediada pelo nervo vago. Tais achados podem ter importantes implicações para a compreensão da fisiopatogenia da doença de Chagas pela inclusão de mais um novo fator mediador, as fibras sensoriais do tipo C, na complexa fisiopatologia da interação parasito-hospedeiro observada no curso natural da doença de Chagas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. J. M.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 76-88, 2009.

BALOUZ V.; AGÜERO F.; BUSCAGLIA C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications. **Advances In Parasitology**, p. 1-45, 2017.

BENARROCH E. E. Autonomic-mediated immunomodulation and potential clinical relevance. **Neurology**, v. 73, p. 236-342, 2009.

BESEDOVYSKY H. O. et al. Immunoregulatory feedback between IL-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, p. 233:652-654, 1986.

BESTETTI, R. B. et al. The resting electrocardiogram of t. cruzi-infected rats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 4, p. 224-229, 1987.

BESTETTI, R. B.; OLIVEIRA, J.S. The significance of electrocardiographic study in experimental Chagas cardiopathy in rats. **Arquivo Brasileiro de Caridologia**, v. 51, n. 2, p. 131-4, 1988.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **The American Journal Of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1537-1547, 2015.

BONNEY K. M. et al. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 421-447, 2018.

BOROVIKOVA L.V. et. al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, p. 458–462, 2000.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop**, v. 4, p. 389–396, nov-dec, 1962.

CABEZA MECKERT, P.M.; CHAMBÓ, J.G.; LAGUENS, R.P. Modification of the pattern of infection and evolution of cardiopathy in experimental Chagas' disease after

treatment with immunosuppressive and trypanocidal drugs. **Medicina**. v. 48, n. 1, p. 7-11, 1988.

CAMANDAROBA E. et al. Trypanosoma cruzi: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism. **International Journal Experimental Pathology**. V. 87, p. 209–217, 2006.

CARDONI R. L.; ANTÚNEZ M. I.; ABRAMI A. A. TH1 response in the experimental infection with Trypanosoma cruzi. **Medicina**. V. 59, Suppl 2, p. 84-90, 1999.

CHAGAS C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.3, p. 219-275, 1911

CHANDRA, M. et al. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi (Tulahuen strain). **International Journal Parasitology**. v. 32, n. 7, p. 897-905, 2002.

CHAN, R. K. et al. A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 5126-5138, 1993.

CHAPADEIRO, E. et al. Cardiac lesions in Wistar rats inoculated with various strains of Trypanosoma cruzi. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.21, n.3, p. 95-103, 1988.

CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J. Essencial Neuroscience in Immunology. **The Journal of Immunology**. v. 198, p. 3389-3397, 2017.

CHAVAN, S. S.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. **Immunity**, v. 46, n. 6, p. 927-942, 2017.

CHEVILLARD, C. et al. Disease Tolerance and Pathogen Resistance Genes May Underlie Trypanosoma cruzi Persistence and Differential Progression to Chagas Disease Cardiomyopathy. **Frontiers In Immunology**, v. 9, p. 1-13, 2018.

COBB, D.; HAMBRIGHT, D.; SMELTZ, R. B. T-bet-independent effects of IL-12 family cytokines on regulation of Th17 responses to experimental *T. cruzi* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 965-971, 2010.

COURA, JR; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p.5-13, 2010.

COURA, JR.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6- S7, 2010.

CUBA, M. B. et al. Effects of Cholinergic Stimulation with Pyridostigmine Bromide on Chronic Chagasic Cardiomyopathic Mice. **Mediators Of Inflammation**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. **Mediators Of Inflammation**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

DALIRY, A. et al. Levels of circulating anti-muscarinic and anti-adrenergic antibodies and their effect on cardiac arrhythmias and dysautonomia in murine models of Chagas disease. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1769-1778, 2014.

DE ARAÚJO, F. F. et. al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. 5, p. 1-8, 2011.

DEVERA, R. et al. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 323-330, 2002.

DIAS DA SILVA, V. J. et. al. Analysis of cardiac autonomic function in hamsters with Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, 2(suppl):11-12, 2003.

DEDOV, V. N.; ROUFOGALIS, B. D. Mitochondrial calcium accumulation following activation of vanilloid (VR1) receptors by capsaicin in dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 95, n. 1, p. 183-8, 2000.

EICKHOFF, C. S. et al. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. **Journal Parasitology**. v. 96, n. 4, p. 758-64, 2010.

EK, M. et al. Distribution of the EP3 prostaglandin E(2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. **The Journal of comparative neurology**, v. 428, n. 1, p. 5-20, 2000.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 10, p. 359-368, 1999.

ERICSSON, A.; KOVACS, K. J.; SAWCHENKO, P.E. A Functional anatomical analysis of central pathwayssubserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 897-913, 1994.

ERICSSON, A. et al. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: Distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. **The Journal Of Comparative Neurology**, v. 361, n. 4, p. 681-698, 1995.

ERIN, N. et al. Capsaicin-mediated Denervation of Sensory Neurons Promotes Mammary Tumor Metastasis to Lung and Heart. **Anticancer Research**, v. 24, p. 1003-1010, 2004.

ESPER, L. et al. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. **American Journal Pathology**, v. 181, n.1, p. 130-140, 2012.

FAULKNER, D. C.; GROWCOTT, J. W. Effects of neonatal capsaicin administration on the nociceptive response of the rat to mechanical and chemical stimuli. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 32, n. 9, p. 656-657, 1980.

FEEREIRA, H. O.; MIZIARA, J. L. Aspectos clínicos da cardiopatia chagásica aguda. In: Cançado JR, Chuster M (editores). **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial; 1985.

FOSTER, S. L. et al. Sense and immunity: Context-dependent neuro-immune interplay. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–11, 2017.

FRANCIS, J. et. al. Acute myocardial infarction induces hypothalamic cytokine synthesis. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, p. H2264-H2271, 2004.

FUENMAYOR, C. et al. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens. **Acta Cardiology**. v.60, n. 1, p. 33-37, 2005.

GOBBI, P. et al. Allopurinol is effective to modify the evolution of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Parasitology Research**. v. 101, n. 5, p. 1459-62, 2007.

GOBBI, P. et al. Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with Trypanosoma cruzi. **Parasitology Research**. v. 107, n. 5, p. 1279-1283, 2010.

GOEHLER, L. E. et al. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Autonomic Neuroscience**, v. 85, n. 1-3, p. 49-59, 2000.

GOLDENBERG, R. C. S. et al. Bone Marrow Cell Therapy Ameliorates and Reverses Chagasic Cardiomyopathy in a Mouse Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 4, p. 544-547, 2008.

GROOM, Z.; PROTOPAPAS, A. D.; ZOCHIOS, V. Tropical diseases of the myocardium: a review. **International Journal Of General Medicine**, v. 10, p. 101-111, 2017

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 673-685, 2009.

HAWK, R. J.; MILLIKAN, L. E. Treatment of oral postherpetic neuralgia with topical capsaicin. *International Journal of Dermatology*, v. 27, n. 5, p. 336-336, 1988.

HUNTER, C. A. et. al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 3311-3316, 1997.

HUSTON, J. M. et. al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 1623–1628, 2006.

JANCSO, G.; KIRALY, E.; JANCSO-GABOR, A. G. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. **Nature**, v. 270, p. 741–743, 1970.

JANCSO, G.; KIRALY, E.; JANCSO-GABOR, A. G. Direct evidence for an axonal site of action of capsaicin. *Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology*, v. 313, n. 1, p. 91-94, 1980.

JANCSO, G.; KIRALY, E. Sensory neurotoxins: chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. **Brain Research**, v. 6210, n. 1-2, p. 83-89, 1981.

JASMIN et al. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. **Microbes And Infection**, v. 16, n. 11, p. 923-935, 2014.

JELICKS, L. A.; TANOWITZ, H. B. Advances in imaging of animal models of Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 75, p. 193-208, 2011.

JOO, F.; SZOLCSANYI, J.; JANCZO-GABOR, A. G. Mitochondrial alterations in the spinal ganglion cells of the rat accompanying the long-lasting sensory disturbance induced by capsaicin. **Life Science**, v. 8, n. 11, p. 621-626, 1969.

JUNQUEIRA, C. et. al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, p. 1-23, 2010.

KOBERLE, F. Chagas's disease and Chagas' syndrome: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 63-116, 1968.

LANG, R.M. et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **Journal of the American Society of Echocardiography**. v. 28, n.1, p.1-39.e14, 2015.

LEVY, R. L. Intranasal capsaicin for acute abortive treatment of migraine without aura. **Headache**, v. 35, n. 5, p. 277-277, 1995.

LI, M. et. al. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. **Circulation**, v. 109, p. 120-124, 2004.

LLAGUNO, M. et. al. The relationship between heart rate variability and serum cytokines in chronic chagasic patients with persistent parasitemia. **Pacing and Clinical Electrophysiology**, v. 34, p. 724-735, 2011.

LU, H et al. Antitumor Activity of Capsaicin on Human Colon Cancer Cells in Vitro and Colo 205 Tumor Xenografts in Vivo. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12999-13005, 2010.

MACHADO, M. P. R. et. al. Autonomic nervous system modulation affects the inflammatory immune response in mice with acute Chagas disease. **Experimental Physiology**, v. 97, n. 11, p. 1186-1202, 2012.

MAIOLI, T. U. et al. Splenectomy increases mortality in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 1, p. 36-45, 2011.

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

MCDONALD, D.M.; BOWDEN, J. J.; BALUK, P.; BUNNETT, N.W. Neurogenic inflammation. A model for studying efferent actions of sensory nerves. **Advances Experimental Medicine and Biology**. v. 410, p. 453-62, 1996.

MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal Role of Interleukin-12 and Interferon- γ Axis in Controlling Tissue Parasitism and Inflammation in the Heart and Central Nervous System during *Trypanosoma cruzi* Infection. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 5, p. 1723-1733, 2001.

MORALES, M. C. et al. Heart damage comparing three strains of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Medicina**, v. 47, n. 5, p. 493-9, 1987.

MOREIRA, O. C. et al. Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2017.

MOREIRA, H. T. et al. Evaluation of Right Ventricular Systolic Function in Chagas Disease Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging. **Circulation. Cardiovascular Imaging**, v.10, n. 3, p. 005571-005577, 2017.

MOTRÁN, C. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: immune response and functional heart damage induced in mice by the main linear B-cell epitope of parasite ribosomal P proteins. **Experimental Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 223-30, 1998.

OYAGBEMI, A.; SABA, A.; AZEEZ, O. Capsaicin: A novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. **Indian Journal Of Cancer**, v. 47, n. 1, p. 53-58, 2010.

PARADA, H. et al. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. **International Journal of Cardiology**. 27;60(1):49-54, jun. 1997.

PÉREZ, A. R. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 235, p. 84-90, 2011.

PÉREZ-MOLINA, J.; MOLINA, L. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PINTO, A. Y. et al. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.

POSTAN, M. et al. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 541-549, 1987.

PRADO, C. M. et al. Micro-positron emission tomography in the evaluation of *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease: Comparison with other modalities. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 900-905, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. **The Lancet Infectious Disease**, v.1, p. 92-100, 2001.

RAMIREZ, L.E. Experimental hamster infection by *Trypanosoma cruzi*: the chronic phase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 253-254, 1993.

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

REY, A. del; BESEDOVSKY, H. O. Immune-Neuro-Endocrine Reflexes, Circuits, and Networks: Physiologic and Evolutionary Implications. **Endocrine Immunology**, p.1-18, 2017.

RIBEIRO, A. L. P. et al. In vivo inhibitory effect of anti-muscarinic autoantibodies on the parasympathetic function in Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 145, p. 339-340, 2010.

ROCHA, N. N. et al. Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology**. v. 133, p. 729-37, 2006.

ROGERIO, A. P.; ANDRADE, E. L.; CALIXTO, J. B. C-fibers, but not the transient potential receptor vanilloid 1 (TRPV1), play a role in experimental allergic airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v.62, n. 1-3, p. 55-62, 2011.

ROGGERO, E. et al. Glucocorticoids and sympathetic neurotransmitters modulate the acute immune response to *Trypanosoma cruzi*. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1437, n. 1, p. 83-93, 2018.

ROMAGNANI, S. Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 470-473, 1996.

ROSAS-BALLINA, M. et. al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, v. 334, p. 98-101, 2011.

ROSSI, M. A. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. **American Heart Journal**, v. 120, p. 233-236, 1990.

SANDERS, V. M. The role of norepinephrine and beta-2-adrenergic receptors stimulation in the modulation of Th1, Th2, and B lymphocyte function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 437, p. 269-278, 1998.

SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. Immunology of experimental Chagas' disease: III. Rejection of allogenic heart cell in vitro. **Journal of Experimental Medicine**, v. 140, p. 398-402, 1988.

SAWCHENKO, P. E. et al. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. **Progress in brain research**, v. 107, p. 201-222, 1996.

SCADDING, J. W. The permanent anatomical effects of neonatal capsaicin on somatosensory nerves. **Journal of Anatomy**, v. 131, n. Pt 3, p. 471-482, 1980.

SCHILTZ, K. C.; SAWCHENKO, P. E. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, p. 5606-5618, 2002.

SERRATS, J.; SAWCHENKO, P. E. CNS activation responses to staphylococcal enterotoxin B: T-lymphocyte-dependent immune challenge effects on stress-related circuitry. **The Journal of comparative neurology**, v. 495, p. 236-254, 2006.

SERRATS, J.; SAWCHENKO, P. E. How T-cell-dependent and -independent challenges access the brain: vascular and neural responses to bacterial lipopolysaccharide and staphylococcal enterotoxin B. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, p. 1038-1052, 2009.

SOUZA, A. P. et al. Magnetic resonance imaging in experimental Chagas disease: a brief review of the utility of the method for monitoring right ventricular chamber dilatation. **Parasitol Research**, v. 97, n. 2, p. 87-90, 2005.

SOUZA, W. Trypanosoma cruzi-Host Cell Interaction. **Frontiers In Immunology**, v. 5, p. 1-2, 2014.

SPRINGER, J. Vagal nerve stimulation in chronic heart failure: an antiinflammatory intervention? **Circulation**, v. 110, n. 4, e34, 2004.

STRAUSS, M.; OKONKO, D. O.; ANKER, S. D. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology International**, v. 62, n. 3, p. 293-9, 2013.

SZOLCSANYI, J.; JANCZO-GABOR, A. G.; JOO, F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v. 287, n.2, p. 157-169, 1975.

TALBOT, S., FOSTER, S. L., WOOLF, C. J. Neuroimmunity: Physiology and Pathology. **Annual Review of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 421–447, 2016.

TEIXEIRA, A. R. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 592-630, 2011.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *Journal Clinical Investigation*, v. 117, p. 289–296, 2007.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 418-428, 2009.

TRISCHMANN, T. M. *Trypanosoma cruzi*: early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. **Experimental Parasitology**, v. 62, n. 2, p. 194-201, 1986.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E. Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. **Life Sciences**, v. 57, p. 1011-1026, 1995.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 12, p. 240–253, 2012.