



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Marília Beatriz de Cuba

EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA COM BROMETO DE
PIRIDOSTIGMINA NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EM
CAMUNDONGOS

Uberaba, MG, 2012

MARILIA BEATRIZ DE CUBA

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA COM BROMETO DE
PIRIDOSTIGMINA NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas. Área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof.Dr. Luiz Eduardo Ramirez Giraldo
Co-orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Julho, 2012

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

C97e Cuba, Marília Beatriz de
Efeitos da estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina na
cardiopatia chagásica crônica em camundongos / Marília Beatriz de Cuba.
-- 2012.
102 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Fe-
deral do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2012
Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Ramirez Giraldo
Coorientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

1. Doença de Chagas. 2. Cardiopatias. 3. Neurônios colinérgicos. 4.
Brometo de piridostigmina. I. Ramirez Giraldo, Luiz Eduardo. II. Uni-
versidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.937

DEDICATÓRIA

Esse trabalho não poderia ser dedicado a outros que não fossem,

A todos que se permitem discordar de observações, questionar, atrever-se a esboçar o raciocínio, formular idéias e opiniões, arriscando-se a ser um livre-pensador. Àqueles que acreditam que fazer ciência não é concordar com todas as observações já confirmadas, como sendo autoprogramadas, mas arriscar, criticar, refutar, debater, investigar e analisar por si mesmo os vários ângulos da ciência, utilizando-se da máxima racionalidade a fim de atingir o seu alvo. Sabendo-se que é preciso acima de tudo desenvolver um espírito de análise, de pesquisa, sendo necessário romper barreiras do convencionalismo, libertando-se da visão castradora e dogmática, buscando enxergar além dos conceitos, sentindo que a busca é compensatória, assim alçando vôo e apresentando-se ao mundo como um cientista. Entre esses estão alguns companheiros de trabalho e orientadores.

A minha família que me permitiram ser uma pessoa forte, com valores, insistente, ousada, e assim favorecendo seguir o caminho que escolhi e sonhei, adentrando pela grande aventura da pesquisa. Sempre me incentivando, mesmo nos momentos que acreditei estar diante do fracasso. Esse que faz parte da ousadia em testar e arriscar, é viver entre os extremos das sensações, o fracasso e o sucesso, a angustia e o alívio.... Enfim pesquisar é como viver, realiza-se planos, projetos, executa de diversas formas, adaptando-se quando necessário, e não sabendo o resultado final....

Ao Professor Valdo o qual tenho grande admiração devido não só a seu incrível potencial científico e intelectual, mas também pelo ser humano que é. Proporcionando-me seguir a orientação com liberdade de pensamento, raciocínio e atuação dentro do laboratório, além da confiança.

A um grande amigo jovem pesquisador, cuja capacidade intelectual, e de desenvolvimento científico é extremamente incrível e de destaque. Esse me proporcionou incentivo e motivação as pesquisas. Depositou confiança em momentos difíceis, estimulando minha curiosidade e ousadia diante da ciência experimental. A quem também possuo grande admiração!!

AGRADECIMENTOS

“As grandes conquistas da Humanidade têm começo no esforço pessoal de cada um. Disciplinando-se e vencendo-se a si mesmo, o homem consegue agigantar-se, logrando resultados expressivos e valiosos. Estas realizações, no entanto, têm início nele próprio”.

Franco, Divaldo Pereira. Da obra: *Momentos de Coragem*

Agradecimento a Deus em primeiro lugar, que permite minha existência e papel funcional diante do compromisso e responsabilidade de viver. Deus que me oferece possibilidade à execução da tão apaixonante pesquisa com algum objetivo seja qual for a favor do bem. Que me guia e proporciona-me o discernimento, a alegria de trabalhar, a matéria prima suficiente para engrandecer-me e resguardar-me, progredir e elevar-me. Oferece-me a semente que germina produzindo prodígios da evolução e aperfeiçoamento espiritual, pessoal e profissional. Deus que me permite ser guiada, orientada e auxiliada pelos bons amigos companheiros e protetores espirituais diante de todos os momentos da minha jornada a fim de que eu tome atitudes sempre respeitando valores correspondentes a um bom caráter e as pessoas.

À minha família pelo amor, dedicação, paciência e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus orientadores Luiz Eduardo Ramirez Giraldo e Valdo Jose Dias da Silva, pela sabedoria, paciência, confiança e orientação.

Aos meus colegas da fisiologia que me auxiliaram diretamente ou indiretamente contribuindo para a finalização desse trabalho. Em especial Lucas Felipe, Angélica Cristina, Lívia Martins e Camila.

A equipe técnica do laboratório, em especial Ana Maria, minha amiga querida, a qual possuo imenso carinho e respeito.

Aos técnicos, professores e colegas do setor de parasitologia, Luciano Paiva, Ana Claudia, Patrícia, Helioswilton, Henrique Kappel, Tiago Pereira, César Gomes, Professora Ana Carolina Faleiros e Eliane Lages Silva. E aos colegas da imunologia Juliana Reis e Marcos Vinícius.

Agradecimento também a Elizabete Perez, minha “madrinha”, a quem tenho muito estima, respeito, sendo esta uma pessoa extremamente especial e querida, que me ajudou em todos os momentos com incentivo, carinho, conselhos, etc.

Enfim a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente me auxiliaram na execução e conclusão deste trabalho.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

[Albert Einstein](#)

Ajustadas ao supremo conforto, no oceano das facilidades materiais, não se forram as criaturas humanas contra os pesares da solidão e da angustia.

Nesse navio prodigioso a que chamamos civilização, estruturado em largueza de conhecimento e primor tecnológico, instalam-se os homens, atingindo luminosa culminância no setor da cultura, em tudo o que tange a proteção da vida física.

Sabemos assim equilibrar a circulação do sangue para garantir a segurança do ciclo cardíaco, mas ignoramos como libertar o coração do cárcere de sombras em que jaz, muitas vezes, mergulhado na poça das lágrimas, quando não seja algemado aos monstros da delinqüência.

Identificamos a neurite óptica com eliminação progressiva dos campos visuais, e medicamo-la com a vantagem possível, na preservação dos olhos; entretanto, desconhecemos como arrancar a visão às trevas do espírito.

Ofertamos braços e pernas artificiais aos mutilados; contudo, somos francamente incapazes de remediar as lesões dos sentimentos.

Interferimos com vasta margem de êxito nos processos patológicos das células nervosas, auscultando as deficiências de vitaminas e enzimas, que ocasionam a diminuição da taxa metabólica do cérebro; todavia, estamos inabilitados a qualquer anulação das síndromes espirituais de aflição e desespero que agravam a psicastenia e a loucura.

Achamo-nos convictos de que a hidrocefalia congênita provém da acumulação indébita do líquido cefalo-raquidiano, impondo dilatação no espaço por ele mesmo ocupado na província intracraniana; no entanto, não percebemos a causa fundamental que a provoca.

Assim tomando-se como alicerce os conceitos rígidos da ciência experimental, conciliada a mensagem consoladora de Deus, buscamos algo sobre o corpo espiritual, em cujas células sutis a nossa própria vontade situa as causas de nosso destino sobre a Terra.

Estudemos sentindo o calor da flama de nosso próprio espírito a palpitar, e ascendendo o lume da esperança, podendo então perceber, em exaltação de alegria, que sob a orientação da mente, trabalhamos em favor da evolução moral e intelectual através do raciocínio.

André Luiz
(Evolução em Dois Mundos, 2010)

RESUMO

Embora a patogênese da doença de Chagas seja altamente complexa e não seja completamente compreendida, é amplamente aceito que um equilíbrio entre a invasão do parasita e a resposta imune-inflamatória do hospedeiro desempenha um papel importante no desenvolvimento e evolução da doença. Nos últimos anos vários trabalhos na literatura vem destacando a marcada influência do sistema nervoso autonômico sobre o sistema imunológico em vários modelos experimentais de doenças com caráter inflamatório, sejam elas infecciosas ou auto-imunes, entre outras. Este trabalho teve como objeto de investigação avaliar os efeitos de modificações na neuroimunomodulação autonômica parassimpática, empregando o agente anti-colinesterásico brometo de piridostigmina, sobre a cardiopatia chagásica crônica experimental em camundongos. Para tal, camundongos C57BL/6j controles (Con) não tratados (NT), ou tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) e camundongos C57BL/6j inoculados com formas tripomastigotas da cepa Romildo, respectivamente, de *T. Cruzi* (Chg) não tratados (NT), ou tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) foram empregados. Todos os animais foram acompanhados por 6 meses e ao final submetidos à avaliação da presença de parasita sanguíneo e tecidual, eletrocardiograma (ECG) convencional sob anestesia, estudo da função autonômica cardíaca por meio de análise de variabilidade da frequência cardíaca e bloqueio autonômico farmacológico com atropina e propranolol, histopatologia do coração e quantificação de citocinas: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon gama (IFN γ), Interleucina 5(IL-5) e IL-10. Ao final do período de observação foi verificada uma significativa alteração do perfil eletrocardiográfico, autonômico e histopatológico, sugestivo de uma resposta inflamatória com desvio da resposta imune para o perfil Th1 nos animais do grupo Chg-NT em relação aos outros grupos estudados. Observou-se que o tratamento crônico com o anticolinesterásico brometo de piridostigmina, nos animais Chg-Pirido, provocou uma redução significativa da resposta imune-inflamatória e fibrose no miocárdio, sem alterações do parasitismo sanguíneo e tissular, sugerindo uma redução da resposta imune perfil Th1 sem alteração do perfil Th2. Tal redução do perfil de resposta Th1 pode ser confirmada em parte pela diminuição nos níveis séricos de IFN γ e tendência a diminuição do TNF- α , sem alteração nos níveis de IL-10 nos animais Chg-Pirido, quando comparados aos Chg-NT. Concluindo, diante da análise em conjunto dos resultados apresentados, nossos achados confirmam a influência do papel neuroimuno-modulatório marcante do sistema nervoso autônomo parassimpático na evolução da resposta imune-

inflamatória ao *T. cruzi*, durante a cardiopatia chagásica crônica experimental em camundongos.

Palavras-chave: sistema nervoso autônomo parassimpático- resposta imune- doença de Chagas

ABSTRACT

Although the pathogenesis of Chagas' disease is highly complex and not completely understood, it is widely accepted that a balance between the invasion of the parasite and the immune-inflammatory response of the host plays an important role in the development and progression of the disease. In recent years many studies in the literature has been highlighting the marked influence of the autonomic nervous system on the immune system in various experimental models of inflammatory diseases, whether infectious or autoimmune diseases, among others. This work had the object of investigation to assess the effects of changes in autonomic parasympathetic neuroimmunomodulation, employing the anti-cholinesterase pyridostigmine bromide on the experimental chronic Chagas' disease in mice. To this end, C57BL/6J mice controls (Con) non treated (NT), or treated with pyridostigmine bromide (Pyr) and C57BL/6J mice inoculated with trypomastigotes of Romildo strain, respectively, *T. Cruzi* (Chg) non treated (NT) or treated with pyridostigmine bromide (Pyr) were used. All animals were followed for 6 months and at the ending they were assessed for presence of blood and tissue parasites, conventional electrocardiogram (ECG) under anesthesia, study of cardiac autonomic function by means of analysis of heart rate variability and pharmacological autonomic blockade with atropine and propranolol, heart histopathology and quantification of cytokines: tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN γ), interleukin 5 (IL-5) and interleukin 10 (IL-10). At the end of the observation period it was observed a significant change in the electrocardiographic profile, autonomic and histopathological findings, suggestive of an inflammatory response with a shift of immune response towards the Th1 in Chg-NT animals compared to the other groups. It was observed that chronic treatment with anticholinesterase pyridostigmine bromide, in Chg-pyrido animals, caused a significant reduction in inflammatory immune response, myocardial fibrosis, without alteration of tissue and blood parasitism, suggesting a reduction in Th1 immune response without changing the Th2. This reduction in Th1 profile can be partly confirmed by a decrease in serum levels of IFN γ and tendency to decrease TNF- α , with no change in levels of IL-10, in Chg-pyrido animals when compared to NT-Chg group. In conclusion, our findings confirm the marked neuroimuno-modulatory role played by parasympathetic autonomic nervous system in the evolution of inflammatory-immune response to *T. cruzi* during the chronic Chagas' disease in experimental mice.

Key words: parasympathetic autonomic nervous system- immune response- Chagas disease

ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** O reflexo inflamatório.29
- Figura 2:** Possível mecanismo fisiopatológico da disfunção autonômica na doença de chagas.....32
- Figura 3:** Valores médios (\pm E.P.M.) das respostas de frequência cardíaca (FC) ou ao propranolol (efeito simpático) ou à atropina (efeito vagal) em camundongos C57BL/6j tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados – Cont) e coletados no 6º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle – WT). (*p <0,015 versus WT-Cont e $\&p$ <0,004 versus Chg-Pirido e $\#p$ <0.004 versus WT-Pirido).....56
- Figura 4:** Valores médios do peso relativo (mg/g) do coração de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido) . (*p <0,029 versus Con-NT e $\&p$ <0,005 versus Chg-Pirido).....57
- Figura 5:** Cortes histológicos de corações de camundongos C57Bl/6j sem infecção por *T cruzi* não tratados com brometo de piridostigmina (C-NT), corados por H&E. (A) Corte histológico dos ventrículos (aumento de 100x). (B) Corte histológico de ventrículo (aumento de 200x).....60
- Figura 6:** Corte histológico de coração de camundongo C57Bl/6j e infetados com *T cruzi* e não tratados com brometo de piridostigmina (Chg-NT), corados por H&E. (A) Corte histológico de ventrículo (aumento de 100x). (B) Corte histológico do ventriculo (aumento de 200x). (C) Corte histológico do ventrículo mostrando um processo de ganglionite indicado pela seta (aumento de 100x). (B) Corte histológico do átrio indicando um processo de neurite (aumento de 200x).....61
- Figura7:** Corte histológico de coração de camundongo C57Bl/6j infetados por *T cruzi* e tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido), corado por H&E. (A e C) Corte histológico de ventriculo (aumento de 100x). (B e D) Corte histológico do ventrículo (aumento de200x).....62
- Figura 8:** Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no ventrículo esquerdo, durante a fase crônica da infecção por *T.cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (*p <0,002 versus Con-NT e $\&p$ <0,007 versus Chg-Pirido e $\#p$ <0.002 versus Con-Pirido).....63
- Figura 9:** Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no ventrículo direito, durante a fase crônica da infecção por *T.cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (*p <0,005 versus Con-NT e $\&p$ <0,017 versus Chg-Pirido e $\#P$ <0.002 versus Con-Pirido).....64

- Figura 10:** Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no átrio direito, durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (**p <0,200 versus Con-NT, *p<0,057 versus Chg-Pirido e **p<0.057 versus Con-Pirido).....65
- Figura 11:** Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no átrio esquerdo, durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (*p <0,200 versus Con-NT, **p<0,229 versus Chg-Pirido e **p<0.857 versus Con-Pirido).....66
- Figura 12:** Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no septo, durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (*p <0,004 versus Con-NT, &p<0,009 versus Chg-Pirido, #p<0.009 versus Con-Pirido).....67
- Figura 13:** Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina TNF- α , de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).....68
- Figura 14:** Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina Il-5, de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).....68
- Figura 15:** Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina IFN- γ , de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido). (*p <0,002 versus Con-NT, &p<0,038 versus Chg-Pirido e ^up<0.006 versus Con-Pirido).....69
- Figura 16:** Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina IL-10, de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido). (*p <0,003 versus Con-NT, #p<0.001 versus Con-Pirido).....70

TABELAS

- Tabela 1: Eletrocardiograma 1.** Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros eletrocardiográficos em camundongos C57BL/6j anestesiados e coletados 1 dia do início do protocolo experimental.....53
- Tabela 2: Eletrocardiograma 2.**Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros eletrocardiográficos em camundongos C57BL/6j anestesiados tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados –Cont) e coletados no 5º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle – WT).....53
- Tabela 3: Eletrocardiograma 3.** Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros eletrocardiográficos em camundongos C57BL/6j anestesiados tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados – Cont) e coletados no 6º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle – WT).....54
- Tabela 4:** Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros de variabilidade do intervalo RR em camundongos C57BL/6j tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados – Cont) e coletados no 6º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle – WT).....55
- Tabela 5:** Valores de scores inflamatório para corações de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).....59
- Tabela 6:** Valores em percentagem para técnica de PAP, para corações de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).....70
- Tabela7:** Análise PCR realizada na fase crônica da infecção por *T.cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido.....71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	absorbância
Ac	anticorpos
Ag	antígeno
A/D	Analógico-Digital
AV	atrio-ventricular
Bpm	batimentos por minuto
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
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 Th 17	Célula T auxiliar 17
Células Treg	Célula T regulatória
Células NK	células natural killer
Chg-Pirido	animais chagásicos tratados com Brometo de Piridostigmina
Chg-NT	animais chagásicos não tratados com Brometo de Piridostigmina
Con-NT	animais controles não tratados com Brometo de Piridostigmina
Con-Pirido	animais controles tratados com Brometo de Piridostigmina
DAMPs	produtos moleculares derivados de patógenos
DPM	desvio padrão médio
ECG	Eletrocardiograma
e cols	e colaboradoradores
HF	componente de alta frequência
HF norm	componente de alta frequência normalizado
HMGB1	Proteínas do grupo de alta mobilidade caixa1
HRV	Variabilidade da Frequência Cardíaca
Hz	Hertz
iRR	intervalo entre ondas R do eletrocardiograma
IFN- γ	interferon gama
IFN- α	interferon alfa
IFN- β	interferon beta
Ig	Imunoglobulina
IL-1	interleucina 1
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-17	interleucina 17
IL-35	interleucina 35
iNOS	sintase do óxido nítrico induzível
LF	componente de baixa frequência
LF-norm	componente de baixa frequência normalizado
LF/HF	razão entre componente de baixa frequência e ecomponente de alta frequência
LF/HF	razão entre componente de baixa frequência e ecomponente de alta frequência

LPS	Lipopolissacrídeos
mAb	anticorpo monoclonal
MN	Mononucleares
Ms	Milsegundos
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NO ₂	Nitrito
P	onda P do eletrocardiograma
PAMPs	produto molecular associado a patógenos
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
PBS	solução salina tamponada
PBS-BSA	solução salina tamponada contendo soro-albumina bovina
PR	intervalo PR do eletrocardiograma
QaT	intervalo QaT do eletrocardiograma
QaTc	intervalo QaT do eletrocardiograma corrigido pela frequência cardíaca do eletrocardiograma.
QRS	complexo QRS do eletrocardiograma
SALB	CHG-animais chagásicos tratados com salbutamol
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SP	substância P
<i>T cruzi</i>	Trypanosoma cruzi
TGF- β	fator transformador do crescimento-beta
TLRs	receptores Toll-like
TNF- α	fator de necrose tumoral –alfa
Um	unidade normalizada
VAR	Variância
LF	componente de baixa frequência
LF-norm	componente de baixa frequência normalizado
LF/HF	razão entre componente de baixa frequência e ecomponente de alta frequência
LPS	Lipopolissacrídeos
VLF	componente de muito baixa frequência (very low frequency)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 ASPECTOS GERAIS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS	21
1.2 RESPOSTA IMUNE NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRONICA	23
1.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO AUTONÔMICA	25
1.3.1 <i>Neuroimunodulação Simpática</i>	27
1.3.2 <i>Neuroimunodulação Parassimpática</i>	27
1.3.3 <i>Reflexo Inflamatório Colinérgico</i>	28
1.4 O SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO NA DOENÇA DE CHAGAS	31
1.5 TERAPÊUTICA NA DOENÇA DE CHAGAS	34
2 OBJETIVO	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
2.2.1. Avaliação do efeito da estimulação colinérgica prolongada sobre a disfunção autonômica cardíaca na fase crônica da doença de Chagas.	38
2.2.2. Avaliação da estimulação colinérgica prolongada sobre parâmetros parasitológicos, imunológicos (citocinas), funcionais cardíacos e morfológicos em corações de animais chagásicos crônicos	38
3 METODOLOGIA	40
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
3.3 INOCULAÇÃO DO PARASITA	42
3.4 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA	42
3.4.1 Microhematócrito	42
3.5 ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO CONVENCIONAL	43
3.6 PROCEDIMENTOS CIRURGICOS	44
3.6.1 <i>Implante de eletrodos</i>	44
3.6.2 <i>Canulação venosa</i>	44
3.7 REGISTRO CONTÍNUO DO ELETROCARDIOGRAMA	44
3.8 BLOQUEIO AUTONÔMICO FARMACOLÓGICO	45
3.9 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	45
3.10 ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO	46

3.11.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	47
3.11.2 Citometria de Fluxo(Cytometric Bead Array).....	48
3.12.1 PCR de amostras de sangue	49
3.12.2 PCR de amostras de Tecido Cardíaco	50
4 RESULTADOS	52
5 DISCUSSÃO	73
5.1 MIOCARDITE E RESPOSTA IMUNE NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	74
5.2 DISFUNÇÃO DO SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	77
5.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO VAGAL NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA	81
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, conhecida também como Tripanossomíase Americana, é um exemplo típico de uma injúria orgânica de processo fisiopatológico complexo (Morris e cols, 1990, Vinhaes & Dias, 2000). É uma doença infecciosa endêmica com alta prevalência em toda América Latina, afeta cerca de 12 milhões de indivíduos, e causa cerca de 50 mil mortes por ano, constituindo-se assim um problema de saúde pública importante (Prata, 2001; Coura Jr. & Viñas, 2010). Em 1909 Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas descreveu as principais características clínicas, e o agente causador da doença, o *Tripanossoma cruzi*, um protozoário flagelado cujo ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros de várias classes de mamíferos, como o homem, e também hospedeiros insetos hemípteros hematófagos, popularmente chamados barbeiros, os quais são considerados os vetores da doença (Coura, 2007).

A transmissão do protozoário ocorre, principalmente, pela deposição de fezes do vetor sobre os tecidos cutâneos e mucosos do homem (Coura, 2003). Segundo Vinhaes e Dias, além da transmissão vetorial da doença, outros mecanismos também são importantes na transmissão desse parasito, como a transmissão transfusional, transplacentária (congenita) e contaminação por ingestão de alimentos (Vinhaes & Dias, 2000).

A infecção se dá após a interação entre o *T.cruzi* e a célula do hospedeiro, envolvendo processos complexos que estão intimamente relacionados com cepa, linhagem e formas infectantes do parasita, além de vários tipos de células alvos do hospedeiro, entre as quais podem ser descritas os macrófagos, células epiteliais, endoteliais, dentríticas, fibroblastos, neurais, e cardiomiócitos, e ainda linfócitos. Assim a invasão das células pelo *T.cruzi* acontece através de uma ligação 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. Seguindo à 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 parasitas 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, onde serão direcionados a outras células, iniciando um novo ciclo, ou são destruídas pelo sistema imune (Alves & Mortara, 2009).

Clinicamente a doença de Chagas é caracterizada por duas fases: a aguda e a crônica. A fase aguda inicia-se após um período de incubação de 7 a 10 dias, tendo duração de 4 a 8 semanas e apresenta-se na maioria dos casos oligosintomática, podendo em alguns casos apresentar-se com febre, dor muscular, irritabilidade, conjuntivite, anorexia, vômitos, diarreia, linfadenopatia, hepato-esplenomegalia, miocardite, em conjunto com alterações laboratoriais (anemia, trombocitopenia, leucocitose com linfocitose e níveis elevados na concentração de enzimas cardíacas). Consequentemente, o hospedeiro desenvolve ao final de algumas semanas uma resposta imune específica sem que os parasitos sejam completamente erradicados, evoluindo para a fase crônica indeterminada, ou ainda para uma fase crônica sintomática. Em aproximadamente 80 a 90% dos casos há um envolvimento cardíaco, caracterizado por miocardite aguda com taquicardia sinusal, alterações de repolarização e baixa voltagem no eletrocardiograma, dilatação das cavidades ventriculares, disfunção sistólica, derrame pericárdico e sinais de insuficiência cardíaca. A análise histopatológica revela miocitólise focal, necrose e grandes áreas de inflamação caracterizada inicialmente por polimorfonucleares e gradativamente substituída por células mononucleares, associada ou não aos ninhos de parasitas e os seus antígenos. Na fase aguda os parasitas são facilmente encontrados no sangue e tecidos (Laranja e cols, 1956; Prata, 2001; Soares & Santos, 2009; Waghbi, 2009).

A fase crônica da doença de Chagas inicia após um período de latência de 2 a 4 meses. Esta apresenta várias formas: indeterminada, cardíaca, digestiva, cardio-digestiva ou nervosa. A forma indeterminada é a mais prevalente (60-70% de pacientes das áreas endêmicas). A forma digestiva está presente em aproximadamente 5-10% dos casos, caracterizada por uma dilatação do esôfago e intestino. Vinte e cinco a 35% desenvolvem cardiopatia, a qual é a forma mais comum, e dentre eles 10% poderão desenvolver cardiopatia grave, manifestando-se sob a forma de arritmias e/ou distúrbios de condução, insuficiência cardíaca, acidentes tromboembólicos e morte súbita (Prata, 2001; Marques e cols, 2006).

A fase crônica indeterminada caracteriza-se pela positividade sorológica e/ou parasitológica e ausência de sintomas e/ou sinais da doença, eletrocardiograma convencional normal, estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais. Mas quando estudadas por métodos propedêuticos mais sofisticados, alguns pacientes mostram alterações estruturais ou funcionais do coração e do trato digestivo (Ribeiro & Rocha, 1998). O diagnóstico é feito através de anticorpos específicos e/ou a presença do parasito em testes parasitológicos diretos ou indiretos (Tostes, Jr e col, 2005).

Após 10 a 30 anos da infecção inicial, aproximadamente 30-40% dos pacientes da forma indeterminada passam a apresentar sinais e/ou sintomas causando a cardiopatia chagásica crônica (CCC) que é uma doença de caráter inflamatório progressivo e fibrosante do miocárdio com hipertrofia celular difusa ou focal, que levam a danos teciduais culminando na cardiopatia dilatada e conseqüentemente em uma insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita. A cardiopatia dilatada normalmente predomina sobre a hipertrofia miocárdica, com uma lesão peculiar caracterizada pelo adelgaçamento e protusão da região apical do ventrículo esquerdo e, menos freqüentemente, do ventrículo direito, chamado de aneurisma apical, lesão vorticilar apical, etc. Todas as áreas do coração podem estar envolvidas, incluindo as vias de condução, embora as camaras direitas pareçam apresentar maior intensidade de comprometimento (Laranja, 1956; Morris e cols, 1990; Prata, 2001; Cunha-Neto e cols, 2009; Soares & Santos, 2009). A patogênese encontra-se em discussão e ainda permanecem obscuras as causas que levam à evolução diferencial para uma das formas clínicas (Medei e cols, 2008). Os exames de ecocardiografica (ECG), raios-X de tórax e eletrocardiograma são importantes para acompanhar o acometimento cardíaco. O ecocardiograma é considerado de grande importância na avaliação da disfunção ventricular sistólica, a qual é reconhecida como o principal fator prognóstico da miocardiopatia chagásica. Ressalta-se também que a dosagem do peptídeo natriurético cerebral ou tipo B (BNP) tem utilidade no diagnóstico de disfunções sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo (Marques e cols, 2006).

1.2 RESPOSTA IMUNE NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRONICA

A escassez de parasitas no tecido do miocárdio, associado à baixa correlação com os níveis de parasitemia e infiltrado inflamatório do miocárdio deu origem a várias teorias para explicar a patogenia da doença: 1-teoria da denervação parassimpática, com base no desequilíbrio autonômico cardíaco (Koberle, 1968); 2-teoria auto-imune, em que o mimetismo molecular entre antígenos parasitários e tecidos do miocárdio induz uma resposta auto-imune contra fibras miocárdicas (Santos-Buch & Teixeira, 1988) e 3-teoria micro-vascular, em que as alterações micro-vasculares induzidas pelo parasita, através de processos tromboembólicos e/ou isquêmicos desempenham um papel significativo na origem da CCC (Rossi, 1990). O desenvolvimento mais recente de técnicas de biologia molecular e imunohistoquímica têm permitido evidenciar antígenos e DNA do parasita em focos inflamatórios no coração, reforçando um papel ativo desempenhado pelo parasita na gênese da CCC (Marin-Neto et al., 2007).

Embora a patogênese da doença de Chagas seja altamente complexa e não seja completamente compreendida, principalmente em relação à cardiopatia chagásica, é amplamente aceito que um equilíbrio entre a invasão do parasita e a resposta imune do hospedeiro desempenha um papel importante no desenvolvimento e evolução das manifestações crônicas da doença. Tem sido descrito um desequilíbrio na resposta do perfil Th1/Th2, que se relaciona com o equilíbrio na resistência/suscetibilidade ao parasita. Alguns estudos sugerem a importância do equilíbrio dessa relação do perfil Th1/Th2, para o controle da infecção pelo *T. cruzi*, enquanto outros sugerem que a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias Th1, é o fator mais importante para um mecanismo protetor na doença. A resposta voltada para o perfil Th1 permite, por um lado um controle nos níveis de parasitas tecidual e sanguíneo, mas por outro lado, pode induzir uma resposta inflamatória excessiva que poderia destruir funcionalmente células teciduais, como os cardiomiócitos, levando a necrose tecidual e apoptose, uma vez que há a liberação de uma grande quantidade de quimiocinas e assim quimioatração de células inflamatórias para os tecidos infectados (Teixeira e cols, 2011).

Na fase crônica, acredita-se que persistência do parasita é um fator necessário 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 resposta imune é eficiente, a carga do parasita e as conseqüências 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 e cols, 2010).

Sabe-se que vários tipos de células e moléculas solúveis como as citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF α , IL-12) e as anti-inflamatórias (IL-10, IL-4) têm função no controle da infecção como também na indução da patogênese da doença. Durante a infecção há uma síntese de IL-12 e TNF- α em resposta ao parasita, com isso 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 e cols; 2009).

Na cardiopatia chagásica crônica há 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 e IL-10 (Gutierrez e cols, 2009; Rassi Jr e cols, 2010).

Mais recentemente tem sido descrito também a importância da resposta imune pelas células Th17 e T regulatórias na patogênese da Doença de Chagas, porém esses estudos apresentam resultados controversos. Gutierrez e cols (2009) demonstraram experimentalmente que as células Th17 eram importantes no controle da inflamação cardíaca, mediante a um “feedback” negativo sobre a produção de TNF- α , IFN- γ e quimiocinas. Contudo outros estudos mostrados recentemente por Guedes e cols (2010) revelaram um aumento nos níveis de TNF- α , IFN- γ , quimiocinas, receptores de quimiocinas, expressão da resposta tipo Th1 levando um aumento de infiltrado inflamatório e uma redução no parasitismo cardíaco. Estudos recentes demonstraram que as células T reg, de caráter anti-inflamatório, parecem exercer uma função de garantir a persistência do parasita devido a manutenção e atenuação da resposta imune, por meio das IL-10, IL-35 e TGF- β , esta última estando envolvida na patogênese da deposição de colágeno no processo de fibrose durante a fase crônica da cardiopatia chagásica (Gutierrez e cols, 2009; Cobb e cols, 2010).

O processo imunopatológico desenvolvido na fase aguda continua na fase crônica da infecção, ocorrendo uma diminuição nos níveis de parasitemia e parasitismo tecidual, com presença de focos com infiltrado inflamatório intrafasciculares progressivos que culminam em fibrose e desenvolvimento da cardiomiopatia dilatada. Alguns relatos avaliam que a extensão do dano agudo no miocárdio e a qualidade da resposta imune regulatória esta relacionada com a presença e extensão da cardiopatia crônica, embora alguns estudos realizados em modelos experimentais falham ao simular a fase crônica dessa infecção principalmente devido à baixa frequência de desenvolvimento da cardiomiopatia dilatada nestes modelos (Gutierrez e cols, 2009).

1.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO AUTONÔMICA

A neuroimunologia é uma área da pesquisa muito complexa e de grande interesse, sendo caracterizada por processos mediados através da interação entre o sistema nervoso e imunológico. Cada vez mais se tem descoberto mediadores, como peptídeos comuns, entre os três sistemas neurológico, imunológico e endocrinológico. Citocinas e neuropeptídeos são potencialmente mediadores entre os sistemas neural e imunológico. A interação entre eles culmina com a homeostasia ou a patologia. A situação biológica do indivíduo pode determinar que o sistema nervoso ou imunológico estimule ou mesmo sintetize citocinas,

neuropeptídeos e catecolaminas que podem ser sintetizados em uma célula de um sistema e ter um receptor específico, um alvo em outra célula de outro sistema. A atividade homeostática relaciona-se diretamente com a interação neuro-imune (Sheperd e cols, 2005).

O processo de neuroimunomodulação acontece através da liberação de mediadores químicos, como as citocinas, que irão sinalizar ao sistema nervoso, que por reflexos, poderá modular a resposta imune inata, a inervação simpática, a parassimpática e sensorial além de fatores endócrinos, que poderão suprimir a resposta imune. Ou seja, há uma modulação da resposta imunológica pelo sistema nervoso (Matsuda, e cols, 2012).

O sistema nervoso compreende o sistema nervoso sensorial e o sistema nervoso motor. Este último se divide em sistema nervoso motor somático (controle voluntário dos movimentos) e sistema nervoso motor autônomo (controle involuntário das vísceras e glândulas). O sistema nervoso autônomo ou neurovegetativo subdivide-se em duas vias, simpática e parassimpática. Os neurônios pré-ganglionares simpáticos emergem a partir do terço medial da medula espinhal, segmento toraco-lombar, e enviam axônios através das raízes ventrais para estabelecer sinapses com neurônios nos gânglios da cadeia simpática, próxima à coluna vertebral, ou em gânglios colaterais dentro da cavidade abdominal. Os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos emergem a partir de núcleos do tronco encefálico e dos segmentos sacral da medula espinhal, e seus axônios dirigem-se aos gânglios próximos ou mesmo localizados nos órgãos alvo. As influências fisiológicas simpáticas e parassimpáticas são geralmente opostas, e controlam o padrão cardíaco, pressão sanguínea, motilidade gastrointestinal, temperatura corporal, e outras alterações essenciais as funções vitais. A divisão simpática encontra-se envolvida com a resposta de “luta ou fuga”, relacionado ao comportamento; a divisão parassimpática envolve-se com a manutenção da homeodinâmica, como processos de digestão, crescimento, resposta imunitária e armazenamento de energia (Tracey, 2002; Bear e cols, 2008).

O fluxo de potenciais de ação desses neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos responde à alterações do ambiente tão bem quanto à alterações fisiológicas internas. Esse fluxo de potenciais de ação simpático e vagal são controlados por integrações altamente complexas e organizadas em regiões do sistema nervoso central, de modo que o total de saídas autonômicas é apropriado a uma resposta adequada em um momento particular, além de evidências de função paralela mediando comportamento autônomo e endócrino. Esses neurônios pré-ganglionares são sítios de integração neural e modulação autonômica (Llewellyn-Smith, Verberne; 2011).

O Sistema nervoso autonômico interage com o cérebro, incluindo o hipotálamo, o qual pode modular a função de inúmeros núcleos centrais envolvidos no controle autonômico simpático e parassimpático.

1.3.1 Neuroimunodulação Simpática

Se o equilíbrio do meio interno é ameaçado, seja por agentes externos ou internos, tanto o sistema nervoso simpático quanto o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) são ativados. Isto provoca um aumento nos níveis periféricos de catecolaminas e glicocorticóides que agem em sintonia, objetivando a manutenção da homeodinâmica do organismo (Wilder, 1995).

As Catecolaminas, assim como os glicocorticóides, são tradicionalmente vistos como agentes imunossupressores. Evidências demonstram que em certas condições fisiológicas ou a níveis que podem ser atingidos durante o estresse, as catecolaminas influenciam a resposta imune de um modo menos padronizado, tendo os receptores adrenérgicos uma importância na modulação da resposta imune (Elenkov, 1992).

Todas as células linfóides expressam receptores adrenérgicos, com exceção da célula T helper 2 (Th2) (Sanders, 1998). Esse fato pode dar alicerce mecanicista para a diferente modulação das funções das células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2) por meio das catecolaminas. Estudos experimentais indicam uma diferença na quantidade de receptores beta2 adrenérgico (β 2AR) (Maisel, 1989), onde as células natural killer (NK) possuem o maior número de β 2AR, Th possuindo o menor número de β 2AR e células T citotóxicas (Tc), células B e monócitos possuindo um número intermediário desses receptores. O número de β 2AR pode variar durante a fase de maturação das células (Radojcic e cols, 1991). Alguns trabalhos demonstram que a ativação do receptor β 2 adrenérgico leva a uma inibição dos níveis de TNF α e IL-12 e um aumento na produção de IL-10, evidenciando a função simpática na resposta imune (Elenkov e cols, 1996)

1.3.2 Neuroimunodulação Parassimpática

A flexibilidade e precisão da regulação autonômica é coordenada por feedback sensorial recebido pelo sistema nervoso central de alvos periféricos. Os neurônios pré-ganglionares vagais representam o mais extensivo fluxo parassimpático, inervando muitas

estruturas, incluindo vias aéreas inferiores e superiores, coração, fígado, pâncreas, vesícula biliar, trato gastrointestinal, além de órgãos linfóides como baço e timo. Essa inervação dos órgãos linfóides e fígado podem indicar a interação do sistema nervoso autonômico parassimpático vagal com as células imunes.

Essa interação tem sido mostrada através da estimulação vagal, em vários estudos. A estimulação elétrica direta do nervo vago inibe a liberação de TNF- α em modelos experimentais que receberam dose letal de endotoxina, atenuando-se os efeitos do choque séptico, através do mecanismo molecular e celular que envolve a ACh, o principal neurotransmissor vagal (Borovkova e cols, 2000). Também foi demonstrado recentemente que a estimulação elétrica do nervo vago, transmitida ao gânglio celíaco via nervos simpáticos liberando catecolaminas que estimulam células TCD4⁺ a sintetizar ACh. Esta atua em macrófagos do baço, via sinalização dependente do receptor nicotínico (subunidade $\alpha 7$) para ACh (AChR), assim inibindo a síntese de TNF- α , atenuando a inflamação sistêmica (Rosas-Ballina et al., 2011). Outros estudos mostram que a estimulação com agonistas colinérgicos ou anticolinesterásicos culminam em uma inibição da síntese de TNF- α , além de outras citocinas pró-inflamatórias, que atenuam a expansão do processo inflamatório em vários modelos de doenças inflamatórias e autoimunes como sepse, artrites, doenças inflamatórias intestinais, etc.

Assim o nervo vago é uma estrutura que surge no tronco cerebral que terminando nas vísceras pode controlar respostas fisiológicas às alterações do ambiente, lesões e infecções. Esse circuito neural que tem o nervo vago eferente um papel funcional de inibir a liberação de citocinas é chamado de reflexo inflamatório. E geralmente é dependente da interação da ACh com o receptor nicotínico (subunidade $\alpha 7$) para ACh (AChR) expresso em células do sistema imunológico (Tracey, 2009; Rosas-Ballina e cols, 2011).

1.3.3 Reflexo Inflamatório Colinérgico

Circuitos neurais funcionam através de reflexos a fim de manter a estabilidade fisiológica em órgãos viscerais. Cada reflexo é composto de um arco aferente ou sensorial que detecta alterações ambientais e químicas, um centro de integração, que é o sistema nervoso central que integra as entradas e saídas de sinalizações neurais e de um arco eferente que é representado por inervações que levam as respostas até os neurônios motores nos órgãos alvos. A inflamação é um estímulo a ativação das vias sensoriais que levam a informação até

o hipotálamo, onde há vários centros de integração, que terminam em uma resposta antiinflamatória rápida e subconsciente. Destaca-se entre essas vias do reflexo, a via colinérgica antiinflamatória, baseada em sinais do nervo vago que estimulam a inibição da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células do sistema imune que expressam $\alpha 7$ -AChR. Em vista de resultados mostrados em vários trabalhos, tem sido muito discutido os processos elétricos ou farmacológicos estimulando o nervo vago (alvo de drogas), a fim de diminuir o processo inflamatório (Tracey, 2007; Pavlov, 2008; Hunston & Tracey, 2010; Olosson e cols, 2012). Segundo Shepherd, a influência parassimpática na modulação do processo inflamatório se dá pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), que parece diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1b, IL-6 e IL-18, sem afetar os níveis de citocinas antiinflamatórias como IL-10 (Shepherd e cols, 2005).

O nervo vago representa uma conexão bidirecional entre o cérebro e o sistema imune (figura 1), sendo que a via antiinflamatória colinérgica pode inibir a produção de citocinas e diminuir o processo inflamatório pelo nervo vago que transporta informações sensoriais ao cérebro levando uma resposta oposta, um reflexo inflamatório. As células que produzem citocinas, como macrófagos, expressam receptores nicotínicos (subunidade $\alpha 7$) para ACh (AChR) e leva a uma alteração da sinalização intracelular que acaba por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma mediante o nervo vago, o sistema nervoso central poderia controlar a expressão de citocinas e conseqüentemente o processo inflamatório na CCC (Tracey 2002; Tracey 2007; Andersson & Tracey, 2012; Machado e cols, 2012).

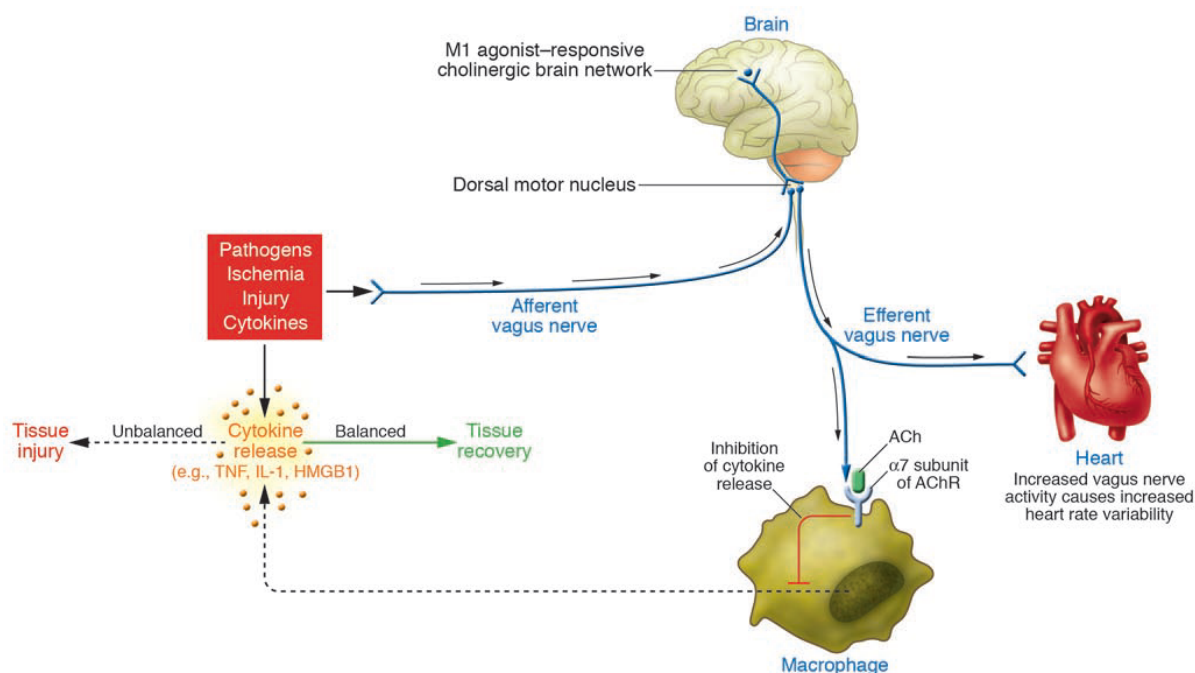


Figura 1: O reflexo inflamatório. O circuito neural que envolve a via colinérgica anti-inflamatória equilibra a produção de citocinas. Agentes patogênicos, bem como a isquemia e outras formas de lesão ativam a produção de citocinas, que normalmente restaura a homeostase. Se a resposta de citocinas é 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 d a via colinérgica anti-inflamatória e também aumentar 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 KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.* **117**:289–296 (2007).

O ramo aferente do reflexo está relacionado à estimulação sensorial de terminações nervosas livres ou células quimiosensíveis por produtos moleculares da infecção como PAMPs e produtos moleculares associados ao dano celular (DAMPs) que ativam células imunes. O arco eferente do reflexo inflamatório, representado pela via anti-inflamatória colinérgica culmina com a liberação do neurotransmissor ACh, o qual interage com receptores $\alpha 7$ -AChRs das células imunes, levando a ativação intracelular que diminui a translocação nuclear do do NF- κ B, suprimindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, entre outros efeitos, culminando na diminuição da síntese e liberação dessas citocinas (TRACY 2002; Tracey 2007, Pavlov 2008, Tracey 2009, Tracey 2010; Matsuda e cols, 2012; Olosson e cols, 2012).

A via antiinflamatória colinérgica pode prevenir conseqüências danosas da resposta imune excessiva, e é fato que os sistemas imune, nervoso e endócrino estão intimamente integrados a fim de garantir um equilíbrio dinâmico dos sistemas do organismo. E esse vínculo é facilmente quebrado em vários tipos de infecções, e entre essas está a doença de Chagas, na qual o *T.cruzi* leva um desequilíbrio entre os três sistemas imune, nervoso e endócrino (Anatel e cols, 2005; Mosovich e cols, 2008).

1.4 O SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO NA DOENÇA DE CHAGAS

A fisiopatogênese da doença de Chagas, como descrito anteriormente, ainda encontra-se em discussão, porém existem hipóteses de que haja uma agressão auto-imune vinculada especialmente ao mimetismo antigênico do *T. cruzi*; e que o parasitismo de baixa intensidade persistente nas fibras cardíacas durante a fase crônica, sejam os mecanismos responsáveis por tal processo fisiopatológico. Segundo Medei e cols (2008), tem sido difícil provar que a auto-imunidade vinculada ao mimetismo antigênico seja a principal causa da doença de Chagas. Mas é quase impossível descartar que a auto-imunidade não esteja envolvida no processo dessa doença. Os mesmos apontam que a maior parte dos trabalhos defensores da teoria da auto-imunidade se limitam a documentar fenômenos de mimetismo antigênico entre o *T. cruzi* e os tecidos do hospedeiro, sem correlação clínico-biológica com a cardiopatia chagásica crônica. Da mesma forma, questiona-se a função do parasita nas lesões cardíacas, uma vez que estudos recentes têm mostrado que o DNA do *T. cruzi* não é exclusivo da forma cardíaca crônica, podendo ser detectado também nas formas assintomáticas, assim como a forma cardíaca da doença pode não ser apenas decorrente da presença do parasito no tecido, mas também do acometimento do sistema nervoso autonômico (Medei e cols, 2008).

O *T.cruzi* gera um efeito total e final nos tecidos que seria resultado do acúmulo de efeitos bioquímicos culminando em distúrbios do sistema imunológico, e assim neuroendócrinos e cardiovasculares. Esses eventos bioquímicos acontecem simultaneamente, e como os sistemas estão interligados, gerando um ciclo semelhante a um mecanismo de feedback positivo, alterando suas funções e desequilíbrio homeodinâmico (Mosovich e cols, 2008). Em 1950 foram observadas lesões em gânglios e fibras nervosas autônomas cardíacas, salientando que todas as avaliações relacionadas ao acometimento do sistema nervoso autônomo na doença de Chagas eram limitadas ao controle da frequência cardíaca como marcador de influência parassimpática (Medei e cols, 2008). Tem sido demonstrado que a

infecção crônica apresenta ganglionites, neurites, perineurites em seu sistema nervoso intracardíaco, com marcada diminuição na densidade ganglionar e despopulação neuronal, tendo como consequência a disfunção cardíaca (Chapadeiro e cols, 1999; Prata, 2001; Marim-Neto e cols, 2007). Sabe-se que a lesão do plexo nervoso parassimpático dos órgãos ocos, especialmente coração e tubo digestivo, estão entre as alterações morfológicas mais importantes ocorridas durante a fase crônica da infecção chagásica humana, sendo acompanhada por destruição neuronal. No coração a disfunção autonômica pode afetar exclusivamente ou em combinação as propriedades elétricas do nó sinusal ou átrio-ventricular, sistema de condução intraventricular e as propriedades elétricas e mecânicas do miocárdio atrial e ventricular (figura 2). Também ocorre a destruição de fibras simpáticas, embora em menor grau que a denervação parassimpática (Medei e cols, 2008; Junqueira Jr, 2012). A intensidade dos distúrbios funcionais autonômicos, sejam simpáticos ou parassimpáticos, estão estritamente relacionados com a forma clínica do comprometimento orgânico. Geralmente uma disfunção autonômica mais leve acontece na forma indeterminada da doença, enquanto que as disfunções mais graves estão relacionadas às formas digestivas e cardiodigestivas, e uma disfunção moderada na forma cardíaca pura (Chapadeiro e cols, 1999; Prata, 2001; Marim-Neto et al, 2007; Junqueira Jr, 2012) .

Além das lesões em diferentes estruturas do sistema nervoso autônomo, danos exclusivos inflamatórios e degenerativos nos efetores da influência autonômica sobre o coração, como o nó sinusal, nó atrioventricular e feixe de His podem levar a uma resultante disfunção cardíaca autonômica. Da mesma forma, lesões no miocárdio podem resultar em distúrbios na modulação autonômica das propriedades elétricas e mecânicas atriais e ventriculares. Como também, lesões nos mecanorreceptores cardíacos e vasculares, quimiorreceptores centrais e periféricos e fibras neurais aferentes cardíacas e pulmonares, podem prejudicar respostas ao barorreflexo cardiopulmonar e modificar o quimiorreflexo. Existem hipóteses que a denervação/disfunção autonômica está diretamente relacionada com graves arritmias cardíacas e morte súbita (Cunha-Neto e cols, 1995; Chapadeiro e cols, 1999; Prata, 2001; Marim-Neto et al, 2007; Medei e cols, 2008; Junqueira Jr, 2012).

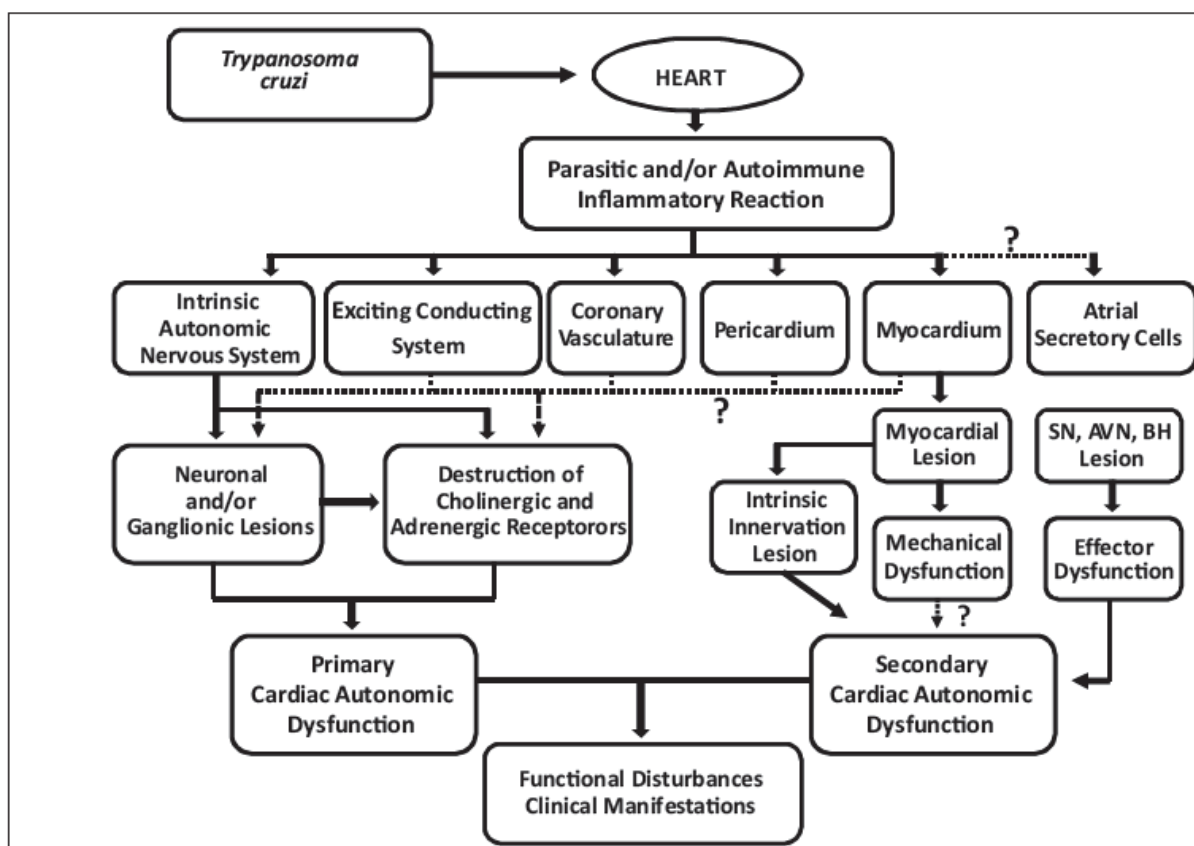


Figura 2: Possível mecanismo fisiopatológico da disfunção autonômica na doença de chagas. O *Tripanossoma cruzi* pode afetar em combinação ou com exclusividade todas as estruturas cardíacas por efeitos de toxicidade e/ou inflamatório, resultando em lesões que afetam a inervação autonômica intrínseca, sistema de excitação-condução e as fibras cardíacas contráteis (**Fonte:** Junqueira Jr LF. Insights into the clinical and functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(2):243-252, mar-abr, 2012).

O envolvimento do sistema nervoso autonômico na doença de Chagas é muito complexo, sendo seu significado fisiopatológico e clínico ainda hoje, um dos maiores desafios a serem superados pelas pesquisas científicas na doença de Chagas. Mas é fato que durante a fase aguda a inervação simpática praticamente desaparece, devido à destruição das fibras nervosas em paralelo a miocardite intensa. Já na fase crônica acontece uma recuperação gradual e completa da inervação simpática cardíaca. Enquanto que a inervação parassimpática apresenta na fase aguda intensa desnervação e conseqüente diminuição da atividade da Ach, na fase crônica encontra-se uma reinervação com recuperação variável de seu estado funcional. Na forma indeterminada, foi também observada uma disautonomia (Medei e cols, 2008; Chapadeiro e cols, 1995), trabalhando com hamsters infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*, demonstraram pela primeira vez, uma desnervação significativa do plexo cardíaco durante a fase crônica, muito semelhante àquela observada em humanos com a doença de Chagas, possivelmente como conseqüência do processo inflamatório (ganglionite). Esta

desnervação pode ser considerada como contribuinte para a patogênese das alterações cardíacas (arritmias, extrassístoles, etc.), assim como das manifestações digestivas, (megaesôfago e megacólon) que ocorrem na doença de Chagas humana (Chapadeiro e cols, 1995). E de acordo com Medei e cols. (2008), ainda que não constitua mecanismo lesivo primário e independente, a intensa redução da população neuronal cardíaca nos vários estágios evolutivos da doença sugere especificidade desse processo na infecção pelo *T. cruzi*, e pode contribuir como mecanismo secundário e amplificador da lesão produzida pelo processo inflamatório (Medei e cols, 2008).

Também foi sugerida por Ribeiro e cols. (2010) a participação de auto-anticorpos contra receptores muscarínicos e beta-adrenérgicos, como agonistas ou antagonistas, em pacientes chagásicos, e a função desses auto-anticorpos na gênese da disfunção autonômica cardíaca desses indivíduos com CCC (Ribeiro e cols, 2010). Resultados de trabalhos recentes têm relacionado os perfis da disfunção autonômica e moléculas do eixo neuro-hipofise-adrenal a diferentes níveis de miocardite, o que mostra a interação neuro-imune exercendo papel nos distúrbios cardíacos e autonômicos. Mas não se pode excluir uma possível influência da disfunção do sistema nervoso autônomo na resposta imunológica na doença de Chagas (Perez e cols, 2011).

1.5 TERAPÊUTICA NA DOENÇA DE CHAGAS

No tratamento da doença de Chagas foram utilizados inicialmente medicamentos com a finalidade de combater o parasito, tais como derivados do quinino, aminos, sulfas, antibióticos e arsenicais que apesar de serem ativos em muitas doenças tropicais, não apresentaram nenhum sucesso. Nos anos 60 iniciou-se o uso dos nitrofuranos, dentre estes, o mais efetivo foi o nifurtimox (*Lampit*), com efeito, tripanomicida, mas foi abandonado pelos efeitos colaterais importantes que apresentava como perda de apetite, emagrecimento, irritabilidade e alterações temporárias de comportamento. Porém essa droga realmente levou à cura de vários casos agudos e mesmo de alguns crônicos. Mais adiante surgiu outro fármaco, um derivado imidazólico denominado "benznidazol" (*Rochagan*), que atua sobre tripomastigotas e amastigotas, mas também apresentava efeitos colaterais como reações na pele (semelhantes à urticária), alterações digestivas, neurite e diminuição de glóbulos brancos no sangue. A elevada frequência de efeitos secundários detectados com o nifurtimox e o beznidazol têm causado desânimo aos clínicos no tratamento para esta doença, apesar de que atualmente são as únicas drogas que continuam em uso, sendo recomendadas apenas em casos

de doença aguda comprovada ou em alguns casos crônicos mediante as seguintes situações: 1-diminuir a incidência de doença de Chagas pós-transfusional; 2-prevenir a doença de Chagas congênita; 3-prevenir a disseminação e/ou reagudização de um quadro infeccioso quando em imunodepressão e 4-prevenir a transmissão em caso de transplante de órgãos (Storino & Milei, 1994).

Tendo-se em conta os conceitos acima discutidos das interações entre o sistema nervoso autônomo e o sistema imune, recentes pesquisas tem sido publicadas referentes ao papel da neuroimunomodulação vagal sobre a evolução da cardiopatia chagásica crônica (Machado e Dias da Silva, 2012). Estratégias terapêuticas que pudessem aumentar a função vagal cardíaca, por potencializar ou estimular o reflexo anti-inflamatório vagal poderia ter algum efeito benéfico na evolução da cardiopatia chagásica.

Drogas como o Brometo de Piridostigmina, um agente anticolinesterásico reversível e, com efeito vagomimético indireto, o qual tem sido usado tradicionalmente no tratamento da *myasthenia gravis*, devido sua ação na placa motora do músculo esquelético, tem demonstrado algum efeito protetor cardiovascular durante administração de curto prazo levando a redução do impacto de marcadores de risco cardiovascular e melhora na disfunção autonômica (Serra e cols,2009; Zimmerman e cols, 2010). Alguns estudos têm mostrado que o Brometo de Piridostigmina melhora a resposta autonômica e hemodinâmica ao exercício em pacientes com doença coronariana, previne a disfunção do miocárdio e reduz a dispersão do QTc, além de aumentar a variabilidade da frequência cardíaca (HRV) e reduzir a arritmia ventricular em pacientes com insuficiência cardíaca (Castro e cols, 2004; Hoyer e cols, 2008; Serra e cols,2009; Zimmerman e cols, 2010). Portanto, uma vez que ela é uma droga vagomimética, espera-se reduzir o automatismo sinusal, a condutibilidade nodal AV, aumentar o limiar de excitabilidade cardíaca e reduzir o período refratário de nó-sinusal e atrioventricular e reduzir o período refratário atrial entre outros efeitos. Também espera-se um efeito relacionado à via colinérgica antiinflamatória, que levaria a uma melhora dos processos inflamatório e fibrótico, além de uma melhora cardíaca funcional na CCC. Entratanto, na literatura, apenas um único trabalho recentemente publicado explora os efeitos do Brometo de Piridostigmina na doença de Chagas (Machado e cols., 2012). Tal estudo, porém, avalia os efeitos do Brometo de Piridostigmina na fase aguda da doença.

Sabe-se que a doença de Chagas é uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas da humanidade, sendo causa de morbidade e mortalidade não só nas áreas endêmicas, mas também em imigrantes agora residindo em áreas não endêmicas do mundo. Este fato tem trazido novos desafios e oportunidades para o entendimento da cronicidade da

doença, bem como o desenvolvimento das terapias com drogas que atuem no sistema imune e sua modulação sobre as alterações causadas pela doença. Assim sendo, a exploração dessa modalidade terapêutica seria extremamente importante para a compreensão e entendimento do mecanismo da atividade neural na modulação do sistema imune, da imunidade adaptativa e da memória imunobiológica. E também na identificação e descrição de outros reflexos e vias neurais como alvos neuroimonomodulatórios para regular a imunidade adaptativa, bem como a descoberta de novas possibilidades de neurotransmissores e receptores cognatos no desenvolvimento de novas drogas farmacêuticas para o controle da imunidade. Em adição, esses estudos da resposta inflamatória mediada pelo nervo vago também poderiam auxiliar na distinção das vias neurais que controlam a imunidade daquelas que controlam as outras funções do nervo vago (Serra e cols,2009; Huston & Tracey, 2009; Tracey, 2010; Zimmerman e cols, 2010; Nagajoythi e cols, 2012; Andersson & Tracey, 2012; Tracey,2012).

Na doença de Chagas tem sido demonstrado em vários estudos, o envolvimento de uma disfunção autonômica relacionada com a resposta imune e o processo inflamatório. O Brometo de Piridostigmina, sendo um anticolinesterásico, poderia atuar na disfunção autonômica parassimpática na doença de Chagas, através da potenciação funcional da Acetilcolina (ACh), afetando a resposta imunológica durante a inflamação a qual é persistente na fase crônica da doença de Chagas. A ACh promove, via nervo vago, uma inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias pelas células do sistema imune, como os macrófagos que expressam $\alpha 7$ -AChRs, diminuindo o processo inflamatório (Tracey, 2007).

Na fase aguda da doença de Chagas, o Brometo de Piridostigmina, em estudos realizados por nosso grupo, no Laboratório de Fisiologia e de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), mostrou-se eficiente na diminuição do processo inflamatório. Porém mostrou-se ineficiente ao aumentar o número de parasitas nos tecidos e sangue (Machado e cols, 2012). Assim, como foi avaliado seu efeito durante a fase aguda da doença, seria necessária a avaliação desse efeito terapêutico na fase crônica, observando se há ou não influência sobre a evolução da doença de Chagas e menor grau de danos aos tecidos afetados pelo parasita *Tcruzi*.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da estimulação colinérgica com o Brometo de Piridostigmina sobre os parâmetros funcionais eletrocardiográficos, autonômicos cardíacos, histológicos, imunológicos e parasitológicos em camundongos C57BL/6j infectados com a cepa Romildo do *Trypanosoma cruzi* no estágio crônico da infecção chagásica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliação do efeito da estimulação colinérgica prolongada sobre a disfunção autonômica cardíaca na fase crônica da doença de Chagas.

➤ Avaliar o efeito da infecção crônica por *Trypanosoma cruzi* sobre a variabilidade da frequência cardíaca, por meio da análise espectral, em animais tratados com o anticolinesterásico, o brometo de piridostigmina.

➤ Avaliar se há disfunção autonômica cardíaca por meio de bloqueio autonômico farmacológico com atropina e propranolol em camundongos tratados com o anticolinesterásico, o brometo de piridostigmina, em resposta à infecção crônica pelo *T. cruzi*.

2.2.2. Avaliação da estimulação colinérgica prolongada sobre parâmetros parasitológicos, imunológicos (citocinas), funcionais cardíacos e morfológicos em corações de animais chagásicos crônicos

➤ Avaliar a presença do *T. cruzi* durante a infecção crônica, mediante a parasitemia, em camundongos tratados com anticolinesterásico, o brometo de piridostigmina.

➤ Avaliar os parâmetros eletrocardiográficos em camundongos tratados com o anticolinesterásico, o brometo de piridostigmina, durante a infecção crônica pelo *T. cruzi*.

➤ Confirmar os achados histopatológicos (parasitismo tissular, miocardite, ganglionite e fibrose) nos corações dos camundongos tratados com anticolinesterásico, o brometo de piridostigmina, no estágio de infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*.

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6j, machos, com peso entre 20-30 gramas, provenientes do biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG.

Os animais em experimento 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 Institut 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.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais experimentais estudados foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a presença ou não de infecção chagásica ou de tratamento com o Brometo de Piridostigmina. O número de animais utilizados em cada grupo e em cada protocolo experimental foi indicado nos resultados dos experimentos realizados. Os quatro grupos experimentais estão detalhados abaixo:

GRUPO I (Con-NT): Camundongos C57BL/6j inoculados com sangue de camundongo não infectado, fazendo ingestão de água (controle não tratados com Brometo de Piridostigmina), avaliados no 6º mês após inoculação (fase crônica da infecção).

GRUPO II (Con-Pirido): Camundongos C57BL/6j inoculados com sangue de camundongos não infectados, fazendo ingestão de água com brometo de piridostigmina a partir do 5º mês, por 30 dias e avaliados no 6º mês após inoculação (fase crônica).

GRUPO III (Chg-NT): Camundongos C57BL/6j inoculados com 15.000 formas tripomastigotas da cepa Romildo do Trypanossoma cruzi, fazendo ingestão de água (Chagásicos não tratados com Brometo de Piridostigmina), estudados na fase crônica da infecção(6º mês após infecção).

GRUPO IV (Chg-Pirido): Camundongos C57BL/6j inoculados com 15.000 formas tripomastigotas da cepa Romildo do *Trypanosoma cruzi*, fazendo ingestão de água com Brometo de piridostigmina a partir do 5º mês, tratados por 30 dias e avaliados no 6º mês após a infecção pelo *T. cruzi* (fase crônica).

O Brometo de Piridostigmina foi dissolvido diariamente na água de beber dos animais numa concentração em torno de 0.084 mg/mL, o que perfaz uma massa ingerida média diária de 30 mg/Kg. As trocas diárias foram sempre efetuadas no final da tarde e início da noite (entre 17:00 e 19:00hs), para aproveitar o período de vigília e de ingesta hídrica dos animais, o qual é mais importante durante a noite.

3.3 INOCULAÇÃO DO PARASITA

Os animais dos grupos chagásicos foram pesados e a seguir infectados pela inoculação intraperitoneal (i.p.) de 15.000 formas tripomastigotas da cepa Romildo do *Trypanosoma cruzi* em 0,1 mL sangue de camundongos infectados. Após a infecção, os animais foram alojados em gaiolas plásticas, onde tiveram acesso à ração (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR) e à água.

Os grupos de animais controles, de mesmo peso inicial e sexo, receberam por via i.p. 0,1 mL de sangue de camundongos não infectados. Ambos os animais infectados e controles foram submetidos aos mesmos protocolos experimentais entre o 5º e o 6º mês após infecção (fase crônica da infecção).

3.4 AVALIAÇÃO DA PARASITEMIA

3.4.1 Microhematócrito

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* foi confirmada através da técnica de microhematócrito, a qual detectou parasitas circulantes no sangue periférico no 12º dia da infecção. A técnica consiste na coleta de sangue através do plexo orbital, em um tubo de microhematócrito heparinizado. A seguir esses tubos foram vedados e centrifugados a 10.000 rpm (5 minutos). Os parasitas (forma tripomastigota) restantes entre a camada de células vermelhas e plasma foram identificados por microscopia. A positividade no 12º dia (a

partir da inoculação) foi considerada um índice de infecção nos animais chagásicos. Os resultados são expressos como positivos ou negativos, sendo que o resultado foi considerado positivo se qualquer tubo foi positivo e negativo, se todos foram negativos.

3.5 ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO CONVENCIONAL

Para a realização do estudo eletrocardiográfico convencional, os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (1,25%) com uma dose de 250 mg/Kg, via intra peritoneal. 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 4º espaço intercostal direito sobre a linha hemiclavicular; VB = eletrodo no 5º espaço intercostal esquerdo na linha hemiclavicular; VC = eletrodo no 5º espaço intercostal esquerdo na linha axilar anterior (Bestetti e cols., 1987, 1988).

O registro eletrocardiográfico basal foi realizado em todos os grupos experimentais estudados no primeiro dia que antecede a infecção, primeiro dia que antecede o tratamento com brometo de piridostigmina (5º mês após a infecção) e ao final do protocolo experimental, no 6º mês após a infecção (anteriormente à cirurgia para implante de eletrodos e canulação).

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 [$iQaTc = iQaT/\text{raiz}(iRR)$]. 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.

3.6 PROCEDIMENTOS CIRURGICOS

3.6.1 Implante de eletrodos

Após o registro convencional do 3º ECG no 6º mês da infecção (fase crônica), os animais foram anestesiados com Tribromoetanol (1,25%) com uma dose de 250 mg/Kg, via intra peritoneal (i.p) , sendo submetidos ao implante cirúrgico de um par de eletrodos de aço inoxidável posicionados a cada lado da região dorsal alta para o registro contínuo do ECG (derivação I) 48-72h horas após. Os eletrodos foram confeccionados empregando-se um conector de 3 pinos derivado de um conector de 40 pinos (modelo BTPS-40). Três fios de aço inoxidável finos, flexíveis e encapados com teflon foram soldados ao conector de três pinos (pinos laterais: eletrodos ativos e pino central: eletrodo terra). As extremidades livres dos fios de aço inoxidável foram então fixadas no subcutâneo a cada lado da região dorsal alta de modo a permitir o registro da derivação I, enquanto o conector de três pinos e o a extremidade do fio central foram suturados na região cervical dorsal do animal, de modo a impedir uma eventual remoção acidental.

3.6.2 Canulação venosa

Juntamente a cirurgia para implantação dos eletrodos referidos acima, os camundongos foram submetidos ao implante cirúrgico de cânulas de polietileno. As cânulas foram confeccionadas com polietileno PE-10 fundidas a uma extensão de polietileno PE-50 (Clay-Adams Inc.). Estas cânulas foram introduzidas na veia jugular esquerda, guiadas subcutaneamente, e exteriorizadas no dorso do animal, a fim de permitir a administração de drogas, para avaliação do bloqueio farmacológico.

Ao final do procedimento cirúrgico (implante dos eletrodos e canulação venosa), os animais foram colocados em gaiolas individuais para recuperar da anestesia e cirurgia.

3.7 REGISTRO CONTÍNUO DO ELETROCARDIOGRAMA

Após 48-72h horas de recuperação cirúrgica, os animais, canulados e com eletrodos de ECG implantados, foram conectados ao sistema de aquisição de dados do sinal do eletrocardiograma. O registro basal de 30 minutos do eletrocardiograma foi realizado em

animais conscientes e com livre movimentação. A frequência de aquisição de sinal foi de 3000 Hz. O horário de registro foi rigorosamente obedecido entre as 8:00 horas da manhã e as 17:00 horas da tarde. Através dos sinais coletados do ECG foi analisada a variabilidade da frequência cardíaca (VFC).

3.8 BLOQUEIO AUTÔNOMICO FARMACOLÓGICO

O bloqueio autonômico farmacológico, empregado para a avaliação da resposta parassimpática e simpática, foi feito através da administração endovenosa de sulfato de atropina (1 mg/Kg) e propranolol (1 mg/Kg), respectivamente. Em cada grupo experimental, metade dos animais recebeu atropina e em seguida, após 15 minutos, receberam propranolol e a outra metade recebeu propranolol, seguido de atropina 15 minutos depois. Assim o efeito vagal e o efeito simpático, respectivamente foram avaliados em cada grupo experimental.

3.9 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

A partir de sinais de ECG contínuo, séries temporais de intervalo RR (iRR) foram geradas batimento a batimento por processamento do sinal mediante software apropriado (Linear Analysis, University of Milan, Italy). As séries temporais de intervalos RR obtidas foram utilizadas para o estudo da análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca. Foram calculados a média e a variância dos valores de iRR, uma vez que a variância é um índice estatístico de avaliação da variabilidade no domínio do tempo (Task Force, 1996).

Os parâmetros de variabilidade cardiovascular foram estimados no domínio da frequência pelo cálculo das densidades espectrais nas bandas de muito baixa (VLF, <0.1Hz), baixa (LF, 0.1-1.0 Hz) e alta frequência (HF, 1.0-5.0Hz), empregando-se o algoritmo de análise espectral autoregressiva (Task Force, 1996). Assim quantificou-se a frequência central e a potência espectral de cada componente em unidades absolutas, bem como em unidades normalizadas (nu). O procedimento de normalização foi realizado pela divisão da potência do componente de baixa frequência (LF) ou de alta frequência (HF) pela potência espectral total menos a potência espectral do componente de muito baixa frequência (VLF) multiplicado por 100 [(área/variância total-VLF) x 100]. (TASK FORCE, 1996; MALLIANI, 2000).

3.10 ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

Após o estudo funcional, 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) 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), Picrosirius Red, e também se utilizou da técnica de Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP) para *T.cruzi*. As lâminas de HE e PAP foram examinadas ao microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss Inc., Germany). Já as lâminas coradas com Picrosirius red foram analisadas a partir de captura de imagens por câmera fotográfica digital para morfometria de fibrose, pelo programa pelo KS300 (Karl Zeiss).

Através da coloração de HE realizou-se a análise do miocárdio atrial e ventricular, o pericárdio, o endocárdio e a inervação intrínseca do coração (gânglios autonômicos e feixes nervosos). As alterações histológicas foram caracterizadas por meio de uma abordagem semi-quantitativa, utilizando-se um sistema semi-quantitativo de pontuações, segundo Chapadeiro e cols (1988). A avaliação nas diferentes regiões do coração classificou o grau de infiltrado inflamatório em cinco categorias: ausente (-), discretíssimo (-/+), pouco discreto (+/-), discreto (+), moderado (+ +) e intenso (+ + +). Com base na categoria preponderante nas várias regiões avaliadas de uma pontuação global de inflamação miocárdica foi definida para cada animal.

Pela técnica de Picrosirius-Red, avaliou-se o processo de fibrose. Esta técnica consiste basicamente na coloração da proteína colágeno, presente nas fibras colágenas nas fibras reticulares, nas cartilagens e nas membranas basais, em vermelho pelo Sirius Red, e do DNA e RNA em azul, pela hematoxilina, e também do citoplasma das células musculares e epiteliais em róseo ou amarelo pelo ácido pícrico. A realização dessa técnica seguiu os seguintes passos, primeiro corou-se na Solução de picrosirius durante 45', lavou-se rapidamente em água, corou-se com hematoxilina de Harris o dobro do tempo usual, pois ácido pícrico da solução de picrosirius se encarrega de retirar parte da hematoxilina. A seguir lavou-se em água durante 10-15' e para finalizar desidratou, diafanizou e montou os cortes em resina.

A técnica de imunohistoquímica avaliou a presença de antígeno parasitário, pelo acúmulo de material PAP-positivo, facilitando a visualização de ninhos de amastigotas. Para a

técnica, desparafinou 5' em cada xilol(I, II, III), hidratou em água destilada, colocou-se as lâminas em tampão citrato pH 6,0, em cuba de plástico totalmente completa; colocou-se outra cuba com água; ligando-se o microondas em potência máxima, em dois ciclos de 15' e 10' respectivamente; fervendo pelo menos 9' e 5' respectivamente; e deixando 20' dentro do forno, com a porta aberta, esfriando; observando que a lâmina não pode secar. A seguir lavaram-se as laminas em água corrente; colocando em PBS pH 7,0, por 5'; e incubou-se com o anticorpo primário (anti-*T.cruzi*) over-night(anticorpo primário diluído em BSA (bovine serum albumine) 5%/Azida sódica 0,1%. Para finalizar, lavou-se as laminas com PBS 2 vezes (segunda lavagem por 5'); contornou-se com a compressa; colocou-se o anticorpo secundário (biotinilado anti-coelho) (30'); e lavou-se com PBS 2 vezes (segunda lavagem 5'); contornando com a compressa. Enfim colocou-se o anticorpo terciário (30'), lavando com PBS. Revelou-se com água oxigenada 0,3% (20 µL) com cromógeno (DAB); observando ao microscópio; e realizou-se uma contra-coloração com hematoxilina a 50% por 30 segundos; desidratou-se, diafanizou-se e montou-se as lâminas.

3.11 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS

Ao final do protocolo experimental, foi coletado o sangue de animais de cada grupo, através da veia cava inferior, e colocado em tubos secos, a seguir foram centrifugados e assim foi coletado o soro desses animais para dosagem de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2) e do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-10). Alíquotas de soro foram separadas e congeladas a -20°C para posterior detecção das citocinas séricas por ELISA e citometria de fluxo. O ensaio da detecção de citocinas foi realizado no laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

3.11.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Pelo ensaio imunoenzimático (ELISA tipo sandwich) utilizando pares de anticorpos comercialmente disponíveis, foram dosadas as citocinas do perfil Th1, IFN γ , e do perfil Th 2, IL-10 presente no soro dos animais não-infectados e infectados.

Placas de polipropileno de alta afinidade, com 96 poços de fundo chato (NUNC-Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais (50µL) contra IFN- γ e IL-10 (OptEIA™, Biosciences Pharmingen, 1:250 diluídos em tampão Coating

(cabornato/bicarbonato, pH 9,2) “overnight” a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS/Tween a 0.05% em lavadora automática, bloqueadas por 4 horas em temperatura ambiente, em solução PBS-BSA (solução salina tamponada com fosfato mais albumina sérica bovina a 2%) e lavadas novamente com PBS/Tween a 0.05%. As amostras foram distribuídas em diluições 1:2 em PBS BSA 2%. As amostras foram incubadas “overnight” a 4°C, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween a 0.05% e distribuiu-se anticorpo secundário, conjugado com biotina por 2 horas a 37°C. As placas foram novamente lavadas com solução de PBS/Tween a 0,05% e incubadas com peroxidase (2 horas a 37°C). Finalmente, após nova lavagem com solução de PBS/Tween a 0,05%, as placas foram incubadas com nitrofenil-fosfato (NPP) (Sigma) 1mg/ml em tampão di-etanolamina pH 9,4, protegidas da luz. As placas foram lidas em leitor de microplacas com o filtro de 405nm (*Biorad 2550 Reader EIA, USA*). A concentração das citocinas foi determinada por análise da absorvância obtida nas amostras.

3.11.2 *Citometria de Fluxo (Cytometric Bead Array)*

O Kit CBA (BD Biosciences) (cytometric beads array) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas do perfil Th1(TNF- α , IL-2) e do perfil Th2(IL-4, IL-5) em uma mesma amostra.

Seis populações de beads 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 FACScalibur (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, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de beads e 50 μ L do reagente de detecção Th1/Th2 PE (Mouse Th1/Th2 PE Detection Reagent/1 vial, 4mL). O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogenizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

3.12 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) CONVENCIONAL

PCR consiste em uma técnica de biologia molecular a fim de detectar os parasitas no sangue periférico e tecido cardíaco de todos os animais após 6 meses da infecção (fase crônica) no final do período experimental. A técnica consiste na detecção sensível de parasitas, sendo uma técnica adequada no monitoramento da Doença de Chagas Crônica, uma vez que poderia ter uma estimativa de reativação da doença.

3.12.1 PCR de amostras de sangue

Para tal experimento foi colhido amostra de sangue total em tubos contendo 6M guanidina HCl com 0,2 M EDTA (pH 8) (V/V). Desse lisado, foi extraído o DNA. Primeiramente homogeneizaram os tubos contendo o lisado, coletaram-se 300µL e transferiu-se esse volume para tubos ependorfs (1,5mL) (tubo 1), foi então acrescentado 200µL de fenol destilado e tamponado (parte inferior, uma vez que a parte superior é tampão). A seguir adicionou-se 200µL de clorofórmio, homogeneizando lentamente os tubos. Centrifugou os tubos a 10000 por 5 minutos, coletando a seguir o sobrenadante e transferindo-o para outro tubo ependorf (1,5 mL) (tubo2). Foi acrescentado ao pellet (tubo 1) 200µL de água destilada autoclavada e irradiada, tampando e agitando lentamente por 5 minutos. Centrifugou a 10000 rpm por 5 minutos, coletou o sobrenadante, transferindo-o para o tubo 2. Neste adicionou-se clorofórmio V/V, homogeneizando-o por 5 minutos, centrifugou-os 10000 rpm por 5 minutos. A seguir aspirou-se 300µL do sobrenadante transferiu para outro tubo ependorf (1,5mL) e então foi adicionado 30µL (10%) de acetato de sódio (3M, pH5,2) e 2 µL de glicogênio (40mg/mL) com volume final de 330µL. Após acrescentou-se 660 µL de etanol destilado gelado (2v/v), homogeneizou-se com o dedo, e deixou 15 minutos em banho de gelo. Centrifugou os tubos a 13000 rpm por 15 minutos, decantou-se, adicionou-se 200µL de etanol 70% e homogeneizou-se com o dedo. Centrifugou-se por 15 minutos a 13000rpm. Deixou-se decantar e secar. E finalmente adicionou-se 30µL de LOW-TE, homogeneizando-se e armazenando a 4°C.

Após 36 horas da extração do DNA, foi feito a amplificação do fragmento desejado (330pb) na reação de PCR, esta sendo realizada com os iniciadores 121- 5' AAATAATGTACGGGGAGATGCATGA 3' e 122- 5' GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA 3', relativa a região constante dos minicirculos da

rede de kDNA do *T.cruzi*. A amplificação específica do DNA do *T.cruzi* foi realizada com um mix em um volume final de 20µL, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 3,5mM MgCl₂, 75 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,0 unidade de Taq DNA polimerase, 20pmol de cada iniciador (121 e 122), 2µL de DNA e 30 µL de óleo mineral.

A seguir o mix foi levado ao termociclador para a reação de amplificação, sendo a primeira etapa de 1 ciclo de desnaturação a 95° C por 5 minutos, uma segunda etapa de 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 1 minuto. A associação a 65° C por 1 minuto e a extensão a 72° C por 1 minuto, seguida de uma outra extensão de 10 minutos.

Para finalizar o experimento, foi feita a revelação dos produtos da reação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6,0% corados com Nitrato de Prata. E então fotografou-se os resultados expostos nos géis de poliacrilamida, em câmera digital.

3.12.2 PCR de amostras de Tecido Cardíaco

A metade dos corações foi destinada a análise por PCR, sendo esse tecido macerado sobre plástico transparente (7x7 cm) esterilizados previamente com álcool 70% e radiação UV por 15 minutos. A seguir, esse macerado de tecido cardíaco foi transferido para tubos ependorfs (1,5 mL) estéreis, sendo submetidos a extração de DNA pelo método da lise alcalina, este caracterizado por acréscimo de 187,5 µL de NaOH (50mM) e 30µL de óleo mineral. Esses tubos foram levados ao vortex, e fervidos em água Milli-Q por 15 minutos em banho-maria.

A seguir fez-se a neutralização com adição de 30 µL de Tris-HCl 1M (pH= 8,0, 130mM) agitando-se no vótex, e centrifugou-os a 10.000 rpm por 20 segundos. A fase intermediária formada, foi transferida para outro ependorf (0,5mL) na diluição 1:5 (10µL DNA +40µL de água Milli-Q estéril). Então armazenou a amostra a -20° C.

Após 36 horas da extração do DNA, foi feita a amplificação do fragmento desejado (330pb) na reação de PCR, esta sendo realizada com os iniciadores 121-5'AAATAATGTACGGGGAGATGCATGA 3' e 122-5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA3', relativa a região constante dos minicírculos da rede de kDNA do *T.cruzi*. A amplificação específica do DNA do *T.cruzi* foi realizada com um mix em um volume final de 20µL, contendo 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 0,1% Triton X-100, 3,5mM MgCl₂, 75 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,0

unidade de Taq DNA polimerase, 20pmol de cada iniciador (121 e 122), 2 μ L de DNA e 30 μ L de óleo mineral.

A seguir o mix foi levado ao termociclador para a reação de amplificação, sendo a primeira etapa de 1 ciclo de desnaturação a 95° C por 5 minutos, uma segunda etapa de 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 1 minuto. A associação a 65° C por 1 minuto e a extensão a 72° C por 1 minuto, seguida de uma outra extensão de 10 minutos.

Para finalizar o experimento, foi feita a revelação dos produtos da reação por eletroforese em gel de poliacrilamida 6,0% corados com Nitrato de Prata e então fotografou-se os resultados em câmera digital.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados numéricos foram expressos como média (\pm E.P.M.), ou como mediana e os percentis de 25% e 75%. Uma avaliação da normalidade de distribuição, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e da homogeneidade da variância, pelo teste de Bartlett, foi efetuada em todos os parâmetros numéricos coletados, a qual permitiu classificar cada conjunto de resultados como dados paramétricos ou não-paramétricos. Os dados paramétricos foram comparados entre os grupos através do teste de ANOVA de dois fatores (tratamento x doença) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados não paramétricos foram comparados entre os grupos dois a dois pelo teste de Mann-Whitney ou pelo Teste Exato de Fisher para variáveis qualitativas. Foram consideradas significantes as comparações com uma probabilidade de ocorrência de erro tipo I menor do que 0,05.

A técnica do microhematócrito realizada 12 dias após infecção (fase aguda) confirmou em 100% dos animais inoculados, a presença do *T.cruzi*.

Os parâmetros eletrocardiográficos avaliados no 1º dia de protocolo, no 1º dia anterior ao tratamento e ao final do tratamento, podem ser vistos na tabela 1, 2 e 3, respectivamente. Na tabela 1 observam-se os resultados do 1º eletrocardiograma realizado em todos os animais no dia 0, antes de iniciar o experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados, nos diferentes parâmetros analisados.

Na tabela 2 encontram-se os resultados do eletrocardiograma realizado antes de iniciar o tratamento com o brometo de piridostigmina, cinco meses após a infecção. Os animais chagásicos não tratados (grupo Chg-NT) e os animais chagásicos tratados (grupo Chg-Pirido) apresentaram uma significativa elevação dos parâmetros eletrocardiográficos dP, dQRS, iQaT e iQaTc, sugerindo um acometimento global das estruturas cardíacas.

Na tabela 3 encontram-se os resultados de eletrocardiograma um mês após o tratamento, e seis meses após infecção. Os animais Chg-NT continuam com uma elevação significativa nos parâmetros eletrocardiográficos dP, dQRS, iQaT e iQaTc, além de iRR, e iPR, sugerindo um acometimento global de todas as câmaras cardíacas. Mas o tratamento com brometo de piridostigmina tendeu a reduzir de forma significativa o intervalo PR, a dP, e os parâmetros eletrocardiográficos relacionados a função ventricular (dQRS, iQaT e iQaTc) nos animais chagásicos (Chg-Pirido). Os resultados sugerem que o tratamento com Brometo de piridostigmina pode ser efetivo em melhorar alterações elétricas induzidas pela doença de Chagas crônica. Os animais controles não tratados e tratados (grupos Con-NT e Con-Pirido, respectivamente), não apresentaram alterações nos parâmetros eletrocardiográficos analisados, como era esperado para os grupos não infectados, exceto pelo parâmetro \pm PR, o qual foi significativamente maior no grupo Con-Pirido em comparação com o grupo Con-NT .

Tabela 1: Eletrocardiograma 1. Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros eletrocardiográficos em camundongos C57BL/6j anestesiados e coletados 1 dia do início do protocolo experimental.

	Con-NT (n=17)	Con-Pirido (n=17)	Chg-NT (n=17)	Chg-Pirido (n=17)
iRR (ms)	130.57 \pm 3.29	157.58 \pm 5.96	140.77 \pm 3.47	150.57 \pm 4.73
dP (ms)	13.7 \pm 1.40	13.91 \pm 1.47	12.52 \pm 0.66	13.29 \pm 0.88
iPR (ms)	36.32 \pm 2.04	36.19 \pm 2.44	36.89 \pm 1.12	32.8 \pm 1.99
dQRS (ms)	14.58 \pm 1.46	15.24 \pm 1.79	13.9 \pm 0.57	12.65 \pm 0.79
iQTa (ms)	20.46 \pm 2.32	23.15 \pm 3.47	20.52 \pm 1.18	16.96 \pm 1.55
iQTc (ms^{1/2})	1.79 \pm 0.66	1.87 \pm 0.95	1.73 \pm 0.10	1.38 \pm 0.12

Nenhuma diferença estatística significativa (Teste Mann-Whitney).

Tabela 2: Eletrocardiograma 2. Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros eletrocardiográficos em camundongos C57BL/6j anestesiados tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados – NT) e coletados no 5º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle – Con).

	Con-NT (n=10)	Con-Pirido (n=12)	Chg-NT (n=13)	Chg-Pirido (n=17)
iRR (ms)	139.73 \pm 5.22	150.83 \pm 6.02	139.04 \pm 5.62	133.35 \pm 4.04
dP (ms)	13.87 \pm 1.50	13.8 \pm 1.37	18.56 \pm 0.51*	18.84 \pm 0.72 [#]
iPR (ms)	38.83 \pm 2.61	38.72 \pm 2.28	40.64 \pm 0.98	40.17 \pm 1.29
dQRS (ms)	14.6 \pm 1.86	13.61 \pm 1.43	17.53 \pm 1.08*	17.06 \pm 1.00 [#]
iQTa (ms)	20.74 \pm 2.26	17.14 \pm 1.60	22.28 \pm 0.96*	21.2 \pm 1.01 [#]
iQTc (ms^{1/2})	1.74 \pm 0.51	1.42 \pm 0.50	1.9 \pm 0.08*	1.84 \pm 0.09 [#]

(*p < 0,005 versus Con-NT e [#]P < 0.005 versus Con-Pirido).

Tabela 3: Eletrocardiograma 3. Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros eletrocardiográficos em camundongos C57BL/6j anestesiados tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados – NT) e coletados no 6º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle – Con).

	Con-NT (n=10)	Con-Pirido (n=12)	Chg-NT (n=10)	Chg-Pirido (n=17)
iRR (ms)	137.56 \pm 3.37	141.05 \pm 5.38	152.54 \pm 5.01*	152.98 \pm 12.93
dP (ms)	14.01 \pm 1.53	13.38 \pm 1.51	18.68 \pm 0.52* ^{&}	14.63 \pm 0.53
iPR (ms)	37.93 \pm 1.96	44.38 \pm 2.51*	45.45 \pm 2.22*	43.2 \pm 0.99
dQRS (ms)	14.45 \pm 1.39	13.47 \pm 1.37	15.04 \pm 0.53	14.5 \pm 0.41
iQTa (ms)	17.77 \pm 1.87	17.35 \pm 1.38	22.47 \pm 1.04*	18.21 \pm 0.59
iQTc (ms^{1/2})	1.51 \pm 0.51	1.49 \pm 0.47	1.83 \pm 0.09*	1.51 \pm 0.06

(*p <0,005 versus Con-NT e [&]p<0,005 versus Chg-Pirido e [#]P<0.005 versus Con-Pirido).

Na tabela 4 observam-se os resultados da análise da variabilidade do intervalo RR no domínio do tempo (variância) e no domínio da frequência (análise espectral), avaliada pelas modificações autonômicas. Houve uma redução significativa da variabilidade total (variância), dos componentes VLF, LF e HF do intervalo RR nos animais Chg-NT em comparação com os animais Con-Pirido e Con-NT. O tratamento com Brometo de Piridostigmina foi eficaz para uma melhora de algumas dessas alterações decorrentes da doença de Chagas nos animais Chg-Pirido, como os componentes VLF, HF, além da variância, os quais foram melhorados de forma significativa. Esses achados podem ser confirmados ao observar os resultados obtidos ao se realizar os bloqueios farmacológicos, os quais mostraram um marcado aumento do efeito vagal cardíaco nos animais Chg-Pirido, sem modificação no efeito simpático (figura 3).

Tabela 4: Valores médios (\pm E.P.M.) dos parâmetros de variabilidade do intervalo RR em camundongos C57BL/6j tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados – NT) e coletados no 6º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle –Con).

	Con-NT (n=9)	Con-Pirido (n=9)	Chg-NT (n=9)	Chg-Pirido (n=12)
Valor médio (ms)	117.97 \pm 3.97	112.67 \pm 4.14	104.27 \pm 4.32	113.74 \pm 4.33
FC (bpm)	516.81 \pm 8.35	543.57 \pm 9.06	590.61 \pm 9.82	539.07 \pm 8.76
Variância (ms ²)	218.61 \pm 12.35	148.96 \pm 9.91	32.13 \pm 5.12 ^{*&}	63.57 \pm 6.11
VLF (ms ²)	106.06 \pm 8.93	69.37 \pm 7.23	11.76 \pm 2.84 ^{*&}	22.60 \pm 3.90
LF (ms ²)	57.84 \pm 6.28	52.31 \pm 6.23	11.10 \pm 3.77 [*]	21.99 \pm 5.09
LF (nu)	51.83 \pm 4.13	56.24 \pm 4.09	47.80 \pm 4.57	39.25 \pm 4.91
HF (ms ²)	54.71 \pm 6.86	27.19 \pm 4.44	9.01 \pm 3.19 ^{*&}	18.78 \pm 3.53
HF (nu)	47.54 \pm 4.11	41.80 \pm 3.97	48.05 \pm 4.49	58.70 \pm 4.86
LF/HF	2.31 \pm 1.53	4.04 \pm 1.48	2.60 \pm 1.54	2.92 \pm 2.01

(*p <0,005 versus Con-NT e &p <0,005 versus Chg-Pirido).

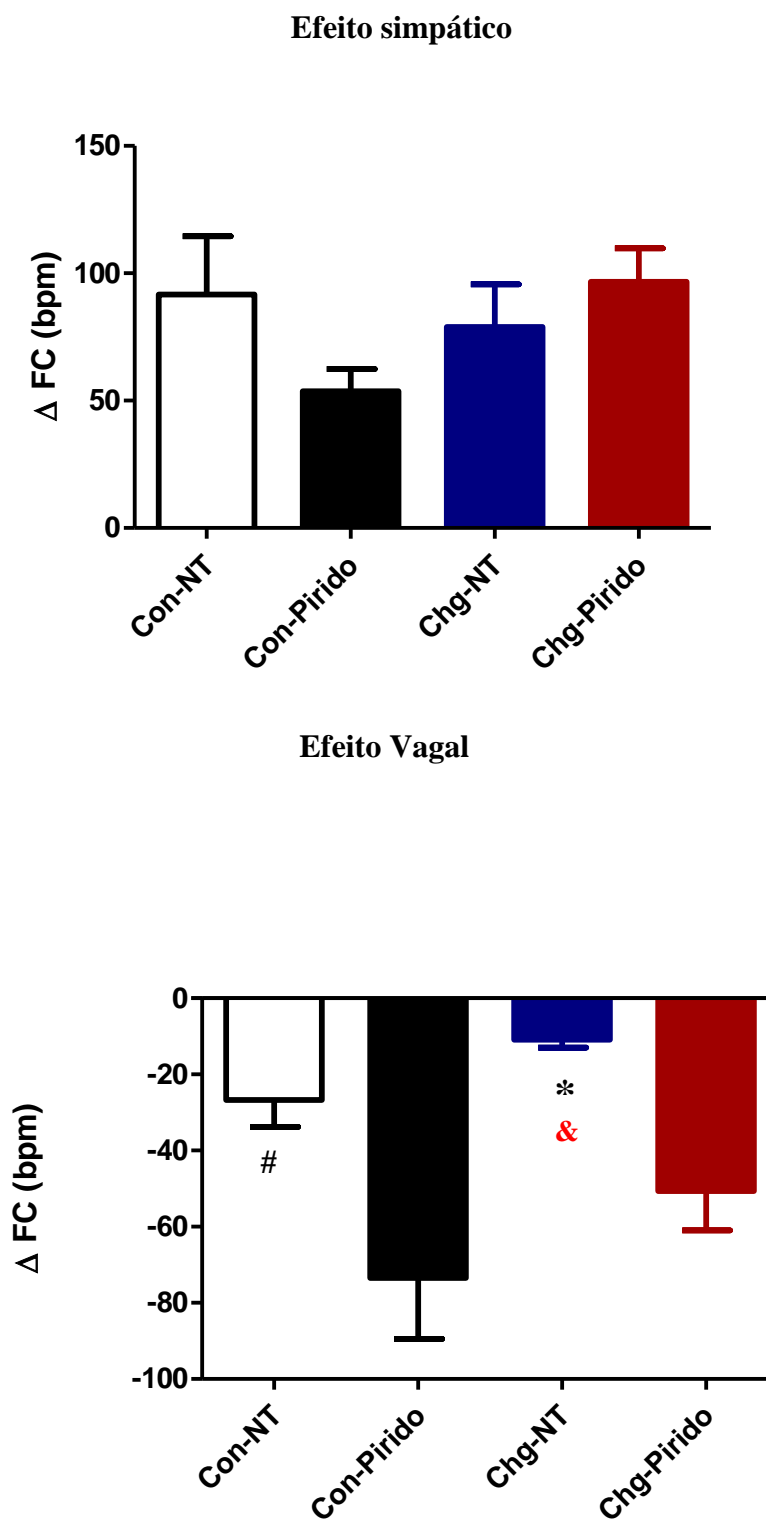


Figura 3: Valores médios (\pm E.P.M.) das respostas de frequência cardíaca (FC) ao propranolol (efeito simpático) ou à atropina (efeito vagal) em camundongos C57BL/6j tratados com brometo de piridostigmina (Pirido) ou não (não tratados – NT) e coletados no 6º mês após a inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (não inoculado controle – Con). (* $p < 0,015$ versus Con-NT e & $p < 0,004$ versus Chg-Pirido e # $p < 0,004$ versus Con-Pirido).

Quando foi avaliado o peso cardíaco relativo (figura 13) percebe-se que o grupo representado pelos animais Chg-NT apresentaram um peso relativo acima do normal, com um valor de 8,71 mg\g. Já os animais do grupo Chg-Pirido apresentaram um valor de 5,71 mg\g, semelhante aos valores dos pesos relativos dos grupos Con-NT, com um valor de 6.68 mg\g e Con-Pirido com um valor de 5,91 mg\g.

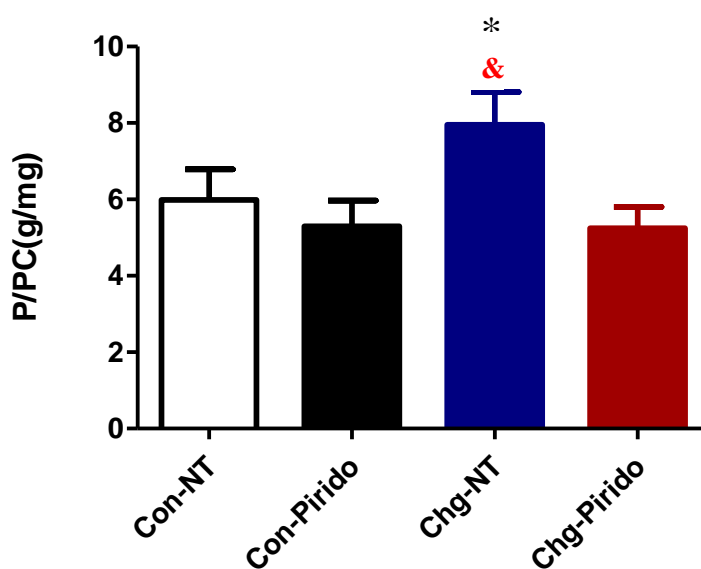


Figura 4: Valores médios do peso relativo (mg/g) do coração de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido). (*p <0,029 versus Con-NT e &p <0,005 versus Chg-Pirido).

Os exames histopatológicos analisados semi-quantitativamente, de forma geral, mostraram variações na reação inflamatória, sendo pouco discreto a discreto no grupo Chg-Con; no grupo Chg-Pirido foi discretíssimo, e nos animais Con-NT e Con-Pirido houve ausência do mesmo. Os corações foram analisados semiquantitativamente nas seguintes regiões: átrios, ventrículos, junção átrio-ventricular, pericárdio, epicárdio, gânglios e neurônios, com a finalidade de discriminar o local mais frequente da presença dos fenômenos inflamatórios. Exemplos representativos dos achados descritos para cada região são mostrados nos apêndices A, B, C, D, E, F e G.

Nos corações foram observados em geral, 16,67 % dos animais Chg-NT um infiltrado inflamatório discreto e 83,33 % desses animais um infiltrado inflamatório pouco discreto. No grupo Chg-Pirido, 49 % dos animais apresentaram um infiltrado inflamatório discretíssimo e 51 % ausência de processo inflamatório. No grupo Con-NT e os animais Con-Pirido mostraram ausência de processo inflamatório (tabela 5).

Tabela 5: Valores de scores inflamatório para corações de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).

	Con-NT (n=13)	Con-Pirido (n=10)	Chg-NT (n=12)	Chg-Pirido (n=16)
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+	-/+
	-	-	+	-/+
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-/+
mediana	-	-	+/-	-
percentil25%	-	-	+/-	-
percentil75%	-	-	+/-	-/+

(- = ausência de infiltrado; -/+ = infiltrado discretíssimo; +/- = infiltrado pouco discreto; + = infiltrado discreto)
 (* p < 0,001 versus Con-NT e & p < 0,001 versus Chg-Pirido (teste de Mann-Whitney))

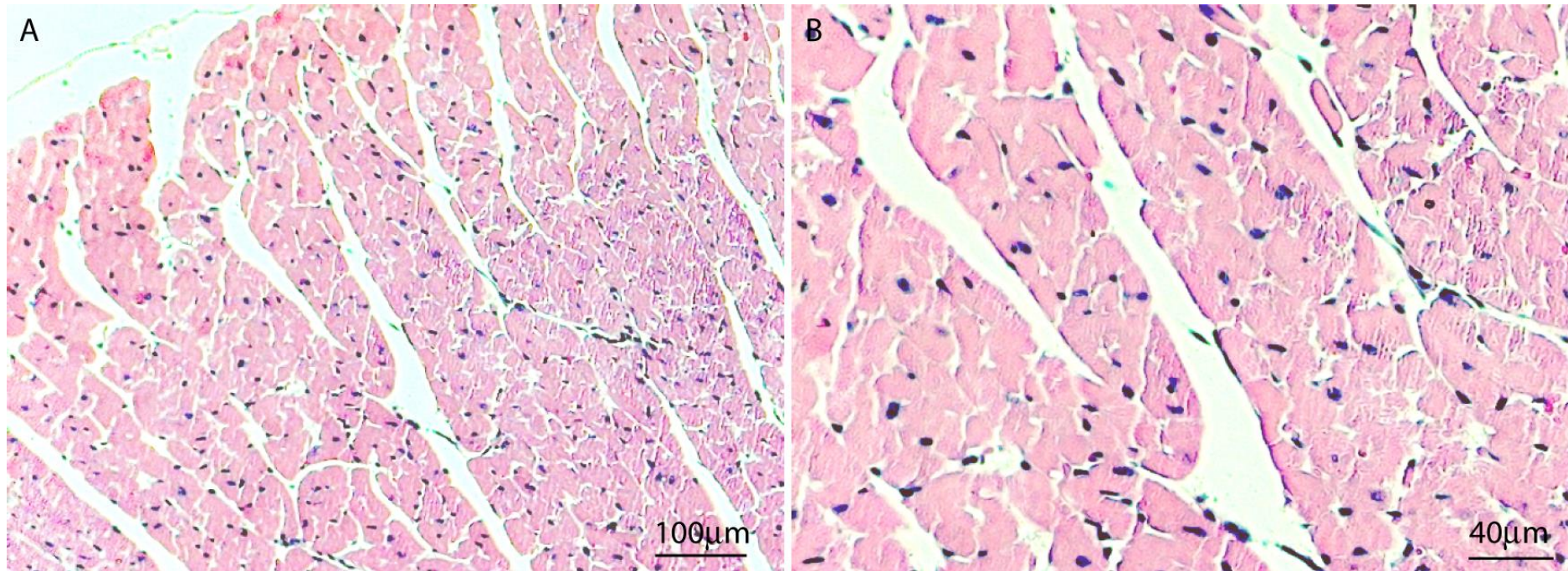


Figura 5: Cortes histológicos de corações de camundongos C57Bl/6j sem infecção por *T cruzi* e corados por H&E. (A) e (B) correspondem a animais não tratados com brometo de piridostigmina, (A) Corte histológico dos ventrículos (x100). (B) Corte histológico De ventrículo (x200).

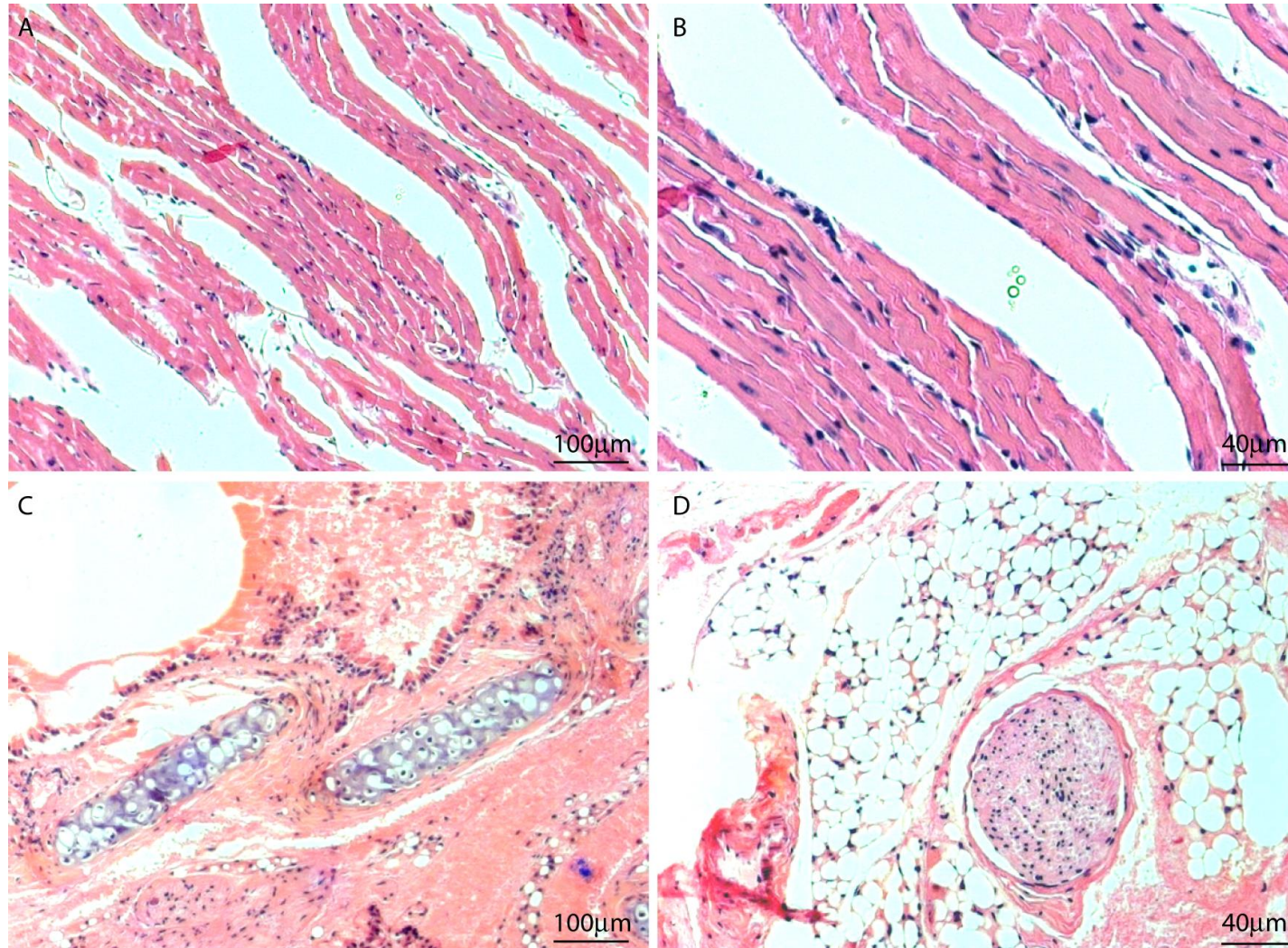


Figura 6: Corte histológico de coração de camundongo C57Bl/6j e infetados com *T cruzi* e não tratados com brometo de piridostigmina (Chg-NT), corados por H&E. (A) Corte histológico de ventrículo (aumento de 100x). (B) Corte histológico do ventrículo (aumento de 200x). (C) Corte histológico do ventrículo mostrando um processo de ganglionite indicado pela seta (aumento de 100x). (D) Corte histológico do átrio indicando um processo de neurite (aumento de 200x).

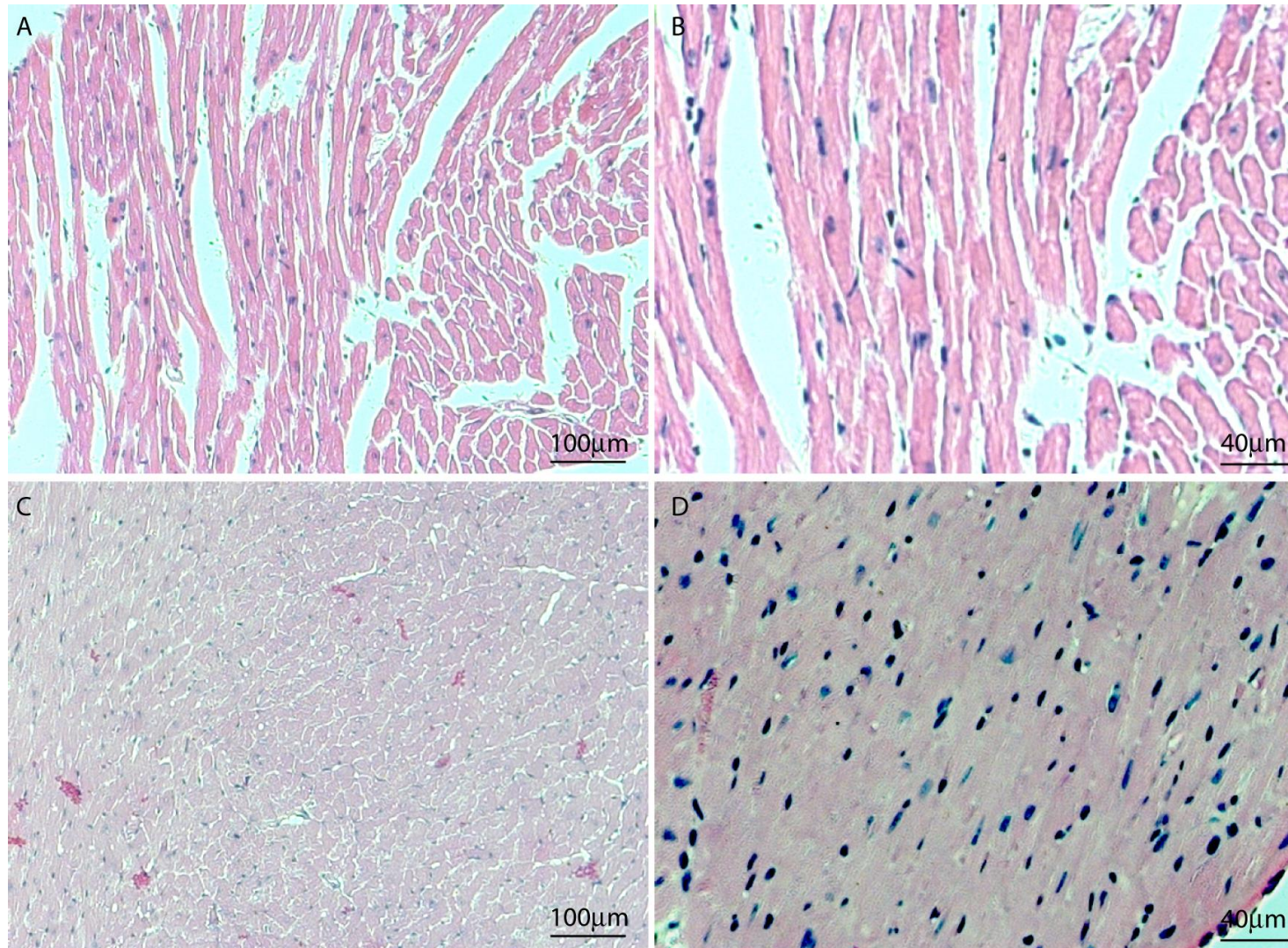


Figura 7: Corte histológico de coração de camundongo C57Bl/6j infetados por T cruzi e tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido), corado por H&E. (A e C) Corte histológico de ventriculo (aumento de 100x). (B e D) Corte histológico do ventrículo (aumento de 200x).

Através da técnica coloração pelo picro Sirius red avaliou-se a morfometria para fibrose pelo programa KS300 (Karl Zeiss, Gerny). No geral, evidenciou-se uma diminuição marcada na área de fibrose nas câmaras cardíacas, tanto em μm^2 quanto em %, nos grupos Chg-Pirido, em relação aos grupos Chg-NT e Con-NT respectivamente.

Analisando a morfometria para fibrose pelo programa KS300 (figura 8), observaram-se resultados em percentagem e μm^2 das áreas de fibrose. Para o ventrículo esquerdo o grupo Con-NT apresentou uma área de fibrose de 0.061%, o grupo Con-Pirido de 0.020%, enquanto o grupo Chg-NT mostrou uma área de 1.109%, diferentemente do grupo Chg-Pirido com 0.115%. Quando utilizada a medida em μm^2 , o grupo Con-NT evidenciou um valor de 103.642 μm^2 , o grupo Con-Pirido um valor de 35.282 μm^2 , o Chg-Pirido um valor de 197.313 μm^2 , enquanto o grupo Chg-Con mostrou um resultado de 1873.715 μm^2 , sendo uma elevação significativa quando comparado com os outros grupos.

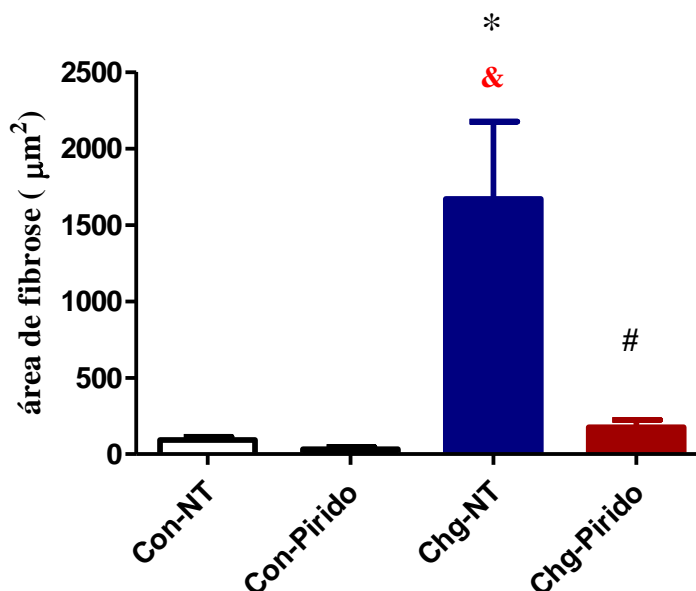


Figura 8: Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no ventrículo esquerdo, durante a fase crônica da infecção por T.cruzi em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (*p <0,002 versus Con-NT e &p<0,007 versus Chg-Pirido e #P<0.002 versus Con-Pirido).

Para o ventrículo direito (figura9), observou-se no grupo Con-NT uma área de fibrose de 0.113%, no grupo Con-Pirido de 0.014%, enquanto o grupo Chg-NT mostrou um valor de 0.815%, diferentemente do grupo Chg-Pirido com 0.163%. Com respeito à área medida em μm^2 , o grupo Con-NT apresentou um valor de 191.994 μm^2 , o grupo Con-Pirido um valor de

24.328 μm^2 , enquanto que os grupos, Chg-NT mostrou um valor de 1353.952 μm^2 e o grupo Chg-Pirido um valor de 277.895 μm^2 , sendo estatisticamente significativos.

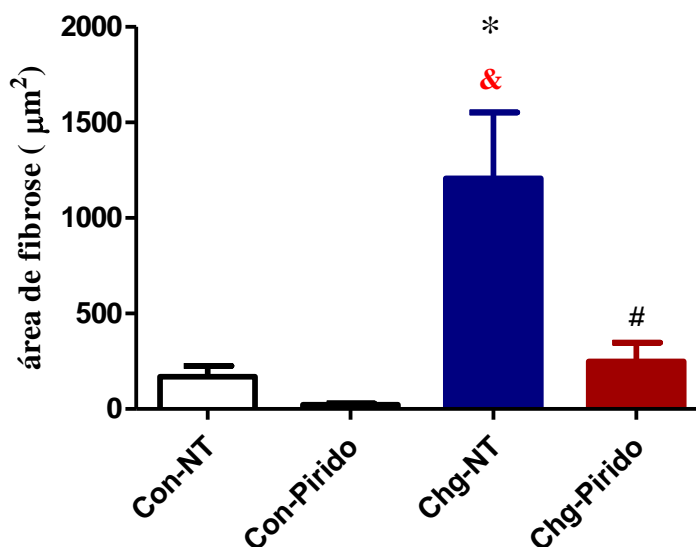


Figura 9: Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no ventrículo direito, durante a fase crônica da infecção por *T.cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (* $p < 0,005$ versus Con-NT e & $p < 0,017$ versus Chg-Pirido e # $p < 0,002$ versus Con-Pirido).

No átrio direito (figura10), observou-se no grupo Con-NT uma área de fibrose de 0.085%, no grupo Con-Pirido de 0.008%, enquanto que o grupo Chg-NT mostrou um valor de 0.643%, diferentemente do grupo Chg-Pirido com 0.215%. A área medida em μm^2 , o grupo Con-NT evidenciou um valor de 146.099 μm^2 , o grupo Con-Pirido um valor de 13.490 μm^2 . Já o grupo Chg-NT mostrou um resultado de 1099.849 μm^2 , e o grupo Chg-Pirido um valor de 368.818 μm^2 . Embora se tenha observado uma tendência ao aumento de fibrose no Chg-NT em relação aos outros grupos, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

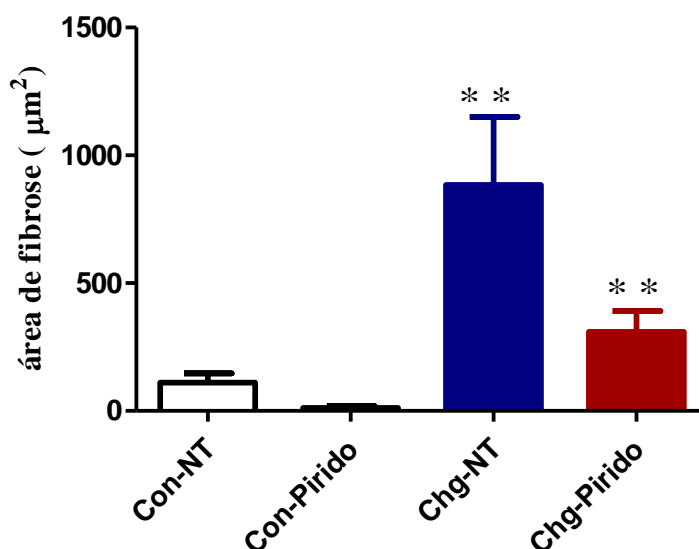


Figura 10: Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no átrio direito, durante a fase crônica da infecção por T.cruzi em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (** $p < 0,200$ versus Con-NT, ** $p < 0,057$ versus Chg-Pirido e ** $p < 0,057$ versus Con-Pirido).

No átrio esquerdo (figura11) evidenciou uma área de fibrose de 0.102% para o grupo Con-NT, 0.041% para o grupo Con-Pirido, enquanto o grupo Chg-NT apresentou para a mesma medida um valor de 0.958% e o grupo Chg-Pirido de 0.423%. E com relação a área medida em μm^2 , o grupo Con-NT apresentou um valor de $173.850 \mu\text{m}^2$, o grupo Con-Pirido um valor de $71.833 \mu\text{m}^2$, o grupo Chg-NT um valor de $1639.934 \mu\text{m}^2$, e o grupo Chg-Pirido $462.222 \mu\text{m}^2$. O grupo Chg-NT apresentou uma tendência ao aumento na área de fibrose em relação aos outros grupos e o Grupo Chg-Pirido apresentou uma tendência discreta ao aumento da área de fibrose em relação ao grupo Con-Pirido, mas as alterações não foram estatisticamente significativas.

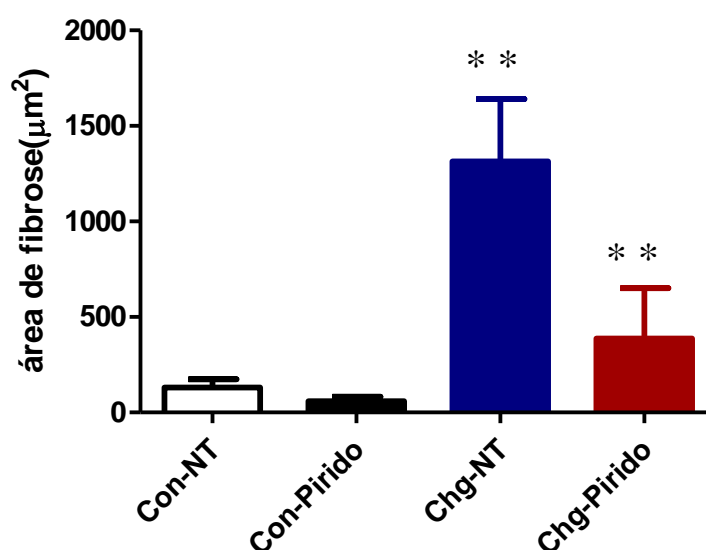


Figura 11: Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no átrio esquerdo, durante a fase crônica da infecção por *T.cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (** $p < 0,200$ versus Con-NT, ** $p < 0,229$ versus Chg-Pirido e ** $P < 0,857$ versus Con-Pirido).

Em relação ao septo (figura 12), observou-se uma área de fibrose em percentagem de 0.104% para o grupo Con-NT, 0.002% para o grupo Con-Pirido, enquanto o grupo Chg-NT apresentou para a mesma medida um valor de 0.594% e o grupo Chg-Pirido de 0.089%. Com relação à área medida em μm^2 , o grupo Con-NT apresentou um valor de $176.327 \mu\text{m}^2$, o grupo Con-Pirido um valor de $3.558 \mu\text{m}^2$, o grupo Chg-NT um valor de $1016.753 \mu\text{m}^2$, e o grupo Chg-Pirido $153.022 \mu\text{m}^2$. O grupo Chg-NT evidenciou uma elevação significativa em relação aos outros grupos e o Grupo Chg-Pirido apresentou um aumento significativo em relação ao grupo Con-Pirido e uma diminuição também significativa em relação ao grupo Chg-NT. Pode-se observar uma diminuição do valor de área do grupo Con-Pirido em relação ao grupo Con-NT, o que poderia sugerir um possível efeito do Brometo de Piridostigmina sobre o processo de fibrose.

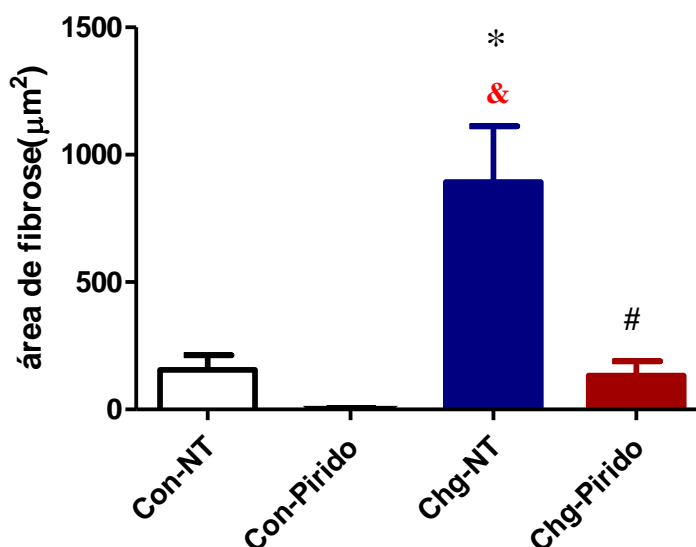


Figura 12: Valores médios de áreas de fibrose (μm^2) obtidos pela análise histológica de Picro Sirius red realizada pelo programa KS300, no septo, durante a fase crônica da infecção por *T.cruzi* em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido. (* $p < 0,004$ versus Con-NT, & $p < 0,009$ versus Chg-Pirido, # $p < 0,009$ versus Con-Pirido).

O estudo das citocinas foi realizado mediante a utilização das técnicas CBA e ELISA. Pela técnica de CBA, observou-se para todos os grupos, que os níveis de concentração (pg/mL), das citocinas IL-2, IL-4 não foram detectáveis já que seus valores foram próximos a 0 pg/mL. Os níveis de concentração de TNF- α (figura 14), entre os diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas. Para a citocina IL-5, também não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos estudados (figura 15).

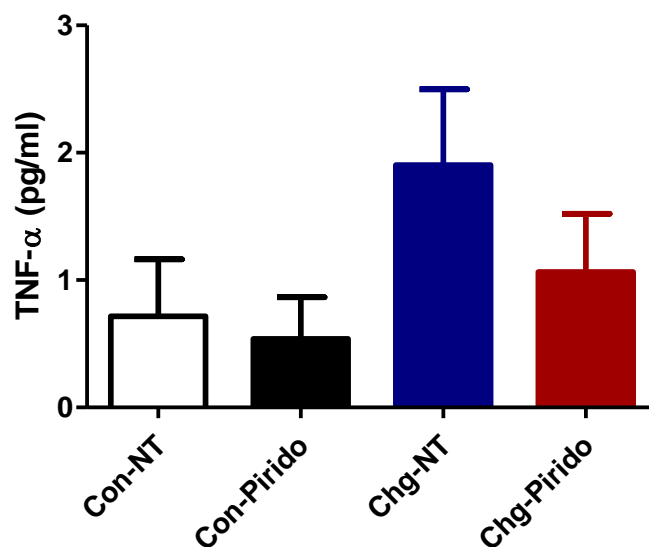


Figura 13: Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina TNF- α , de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6^o mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).

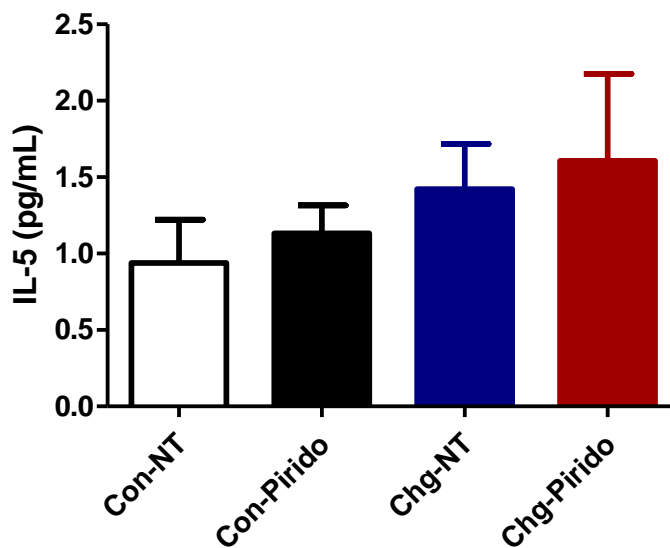


Figura 14: Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina IL-5, de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6^o mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).

Já pela técnica de ELISA, evidenciou-se que os níveis de concentração de IFN- γ mostraram-se aumentados nos animais infectados quando comparados com os não infectados, ressaltando-se que os animais não infectados não apresentaram níveis de concentração dessa citocina. Em relação aos animais infectados, os níveis de IFN- γ do grupo Chg-NT forma maiores que o do grupo Chg-Pirido, possivelmente sendo atenuados pela administração do Brometo de Piridostigmina (figura 16).

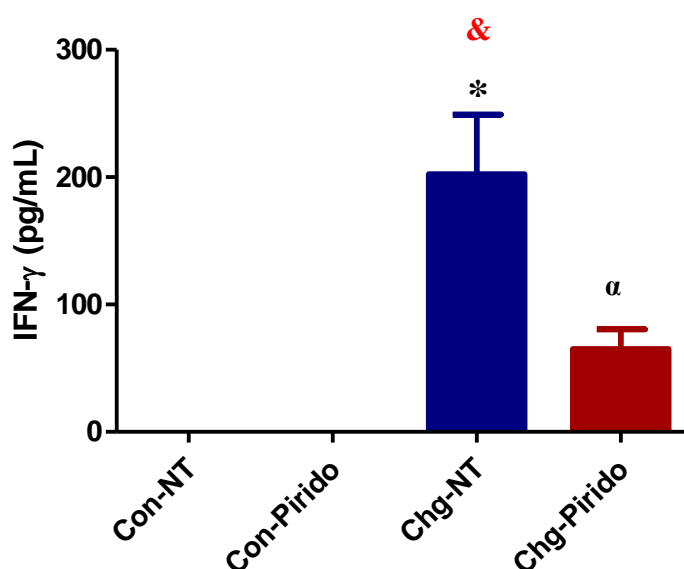


Figura 15: Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina IFN- γ , de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6^o mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido). . (*p < 0,002 versus Con-NT, &p < 0,038 versus Chg-Pirido e αp < 0,006 versus Con-Pirido).

A determinação dos níveis de IL-10 mediante a técnica de ELISA, permitiu observar que entre os grupos infectados (Chg-NT e Chg-Pirido) e não infectados (Con-NT e Con-Pirido) houve diferença significativa, enquanto entre os grupos Chg-Cont e Chg-Pirido e entre Con-NT e Con-Pirido, não houve diferença estatística significativa. O que pode sugerir que o tratamento com Brometo de Piridostigmina não influencia na síntese e secreção desta citocina (figura 17).

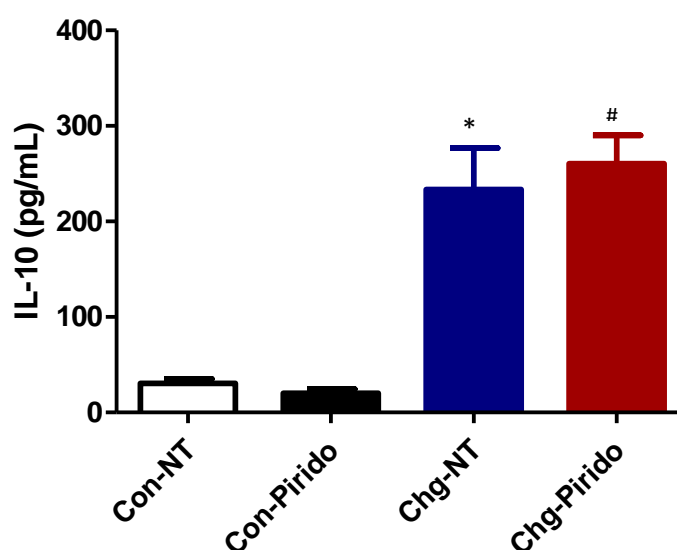


Figura 17: Valores médios dos níveis de concentração (pg/mL) sérica da citocina IL-10, de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido). (*p <0,003 versus Con-NT, #p<0.001 versus Con-Pirido).

A técnica da Peroxidase antiperoxidase foi utilizada para identificação ninhos parasitários (amastigotas) e antígenos de *T.cruzi*. Os resultados foram apresentados em porcentagens de amostras positivas e negativas (tabela 6). Os grupos Con-NT e Con-Pirido 100% dos animais apresentaram resultados negativos, enquanto que o grupo Chg-NT apresentou 62,5% positivo e o grupo Chg-Pirido 81,81% positivo, não sendo observado diferenças significativas importantes.

Tabela 6: Valores em porcentagem para técnica de PAP, para corações de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-NT) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (Con-NT e Con-Pirido).

	Chg-NT	Chg-Pirido
positivo(%)	62.50	81.81
negativo(%)	37.50	18.19

(P<0.603- Test Fisher Exact)

Mediante a técnica da PCR, realizada com a finalidade de demonstrar a presença do parasita na fase crônica da infecção, observou-se que 100% das amostras de tecido e sangue dos grupos Con-NT e Con-Pirido foram negativas. Já analisando os tecidos, encontrou-se que 72,73% das amostras do grupo Chg-NT, 86,67% das amostras do grupo Chg-Pirido eram positivas. Em relação às amostras de sangue, os grupos Chg-NT e Chg-Pirido apresentaram 16,67% e 42,9% resultados positivos, respectivamente (tabela 7).

Tabela7: Análise PCR realizada na fase crônica da infecção por T.cruzi em grupos experimentais Con-NT, Con-Pirido, Chg-NT, Chg-Pirido

	Tecido		Sangue	
	Chg-NT (n=11)	Chg-Pirido (n=15)	Chg-NT (n=7)	Chg-Pirido (n=7)
Positivo(%)	72,73	86,67	16,67	42,9
Negativo(%)	27,27	13,33	83,33	57,1

Não houve diferenças estatísticas significativas, $p < 0,614$ (tecido), $p < 0,559$ (sangue) (Test Fisher Exact)

Sendo a cardiopatia chagásica crônica um problema de saúde pública atualmente globalizado e de grande importância, e sabendo-se do acometimento significativo do sistema nervoso autonômico, e ainda que a regulação rápida e precisa da resposta cardiovascular às modificações ambientais e aos estímulos fisiológicos, realizada predominantemente pelo balanço simpato-vagal, podendo o sistema nervoso simpático e parassimpático atuar de forma antagonista ou sinérgica, dificultando a avaliação específica da contribuição desses componentes, também destacando o papel importante do nervo vago na modulação do processo inflamatório, tem-se essas alterações autonômicas sido objeto de intensas investigações recentemente.

Assim esse estudo avalia e busca compreender o processo neuroimunomodulatório vagal na cardiopatia chagásica crônica através de investigações dos efeitos do anticolinesterásico Brometo de Piridostigmina sobre as alterações autonômicas induzidas pelo *T.cruzi* em camundongos C57Bl/6j, no perfil da resposta eletrocardiográfica, autonômica, histopatológica, imune-inflamatória e parasitológica.

Neste trabalho confirmamos no 12º dia após inoculação das formas tripomastigotas (fase aguda) a infecção pelo *T.cruzi*, através da técnica de microhematócrito, que vem sendo utilizada com eficácia e como método de escolha para a confirmação dessa infecção. Segundo Rassi Jr, a técnica em questão é um método de escolha para identificar até mesmo a infecção congênita, uma vez que é necessária uma pequena quantidade de amostra, além de ser altamente específica (Rassi Jr e cols,2010).

5.1 MIOCARDITE E RESPOSTA IMUNE NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

A patogênese da cardiopatia chagásica crônica não tem sido ainda completamente entendida. Acredita-se que a persistência do parasita seja fundamental, mas não se sabe se o dano tecidual é causado diretamente por fatores do *T.cruzi* ou indiretamente através de mecanismos imunopatológicos ou autoimunes(Rassi e cols, 2010).

Geralmente o parasita tem tropismo pelos cardiomiócitos, e após o parasitismo, como nas outras infecções, há um recrutamento de leucócitos. A migração dessas células depende da produção local de citocinas e quimiocinas, além do aumento do controle da expressão de seus receptores e adesão de moléculas e da atividade de metaloproteínases da matriz

extracelular. As fases aguda e crônica da doença de Chagas são caracterizadas por uma intensa ativação policlonal de linfócitos T e B, as quais são predominantes no tecido cardíaco durante a fase crônica, com atividades citolíticas e produção importante de IFN- γ e IL-10, contribuindo para a patogênese da doença (Gutierrez e cols, 2009).

Segundo De Melo e cols há uma associação entre a produção de IFN- γ e a forma grave de cardiopatia, e uma relação entre os níveis dessa citocina e a morbidade na doença de chagas crônica. Além disso, tem sido mostrado que a presença dos infiltrados inflamatórios de pacientes com cardiopatia chagásica estimulam clones de células T, sendo esses excelentes produtores de IFN- γ . Ainda tem sido discutida a relação inversa entre os níveis de IFN- γ e a gravidade da cardiopatia chagásica. Quanto a IL-10, apesar de seu papel modulatório em pacientes que possuem a forma indeterminada da doença, tem sido observado também um aumento na produção dessa citocina na cardiopatia chagásica crônica (De Melo e cols, 2012).

Neste trabalho ao apresentarmos uma diminuição do processo inflamatório no tecido cardíaco de camundongos infectados e tratados com o anticolinesterásico Brometo de Piridostigmina, em relação a camundongos infectados não tratados, juntamente com a análise das citocinas sanguíneas, podemos sugerir um efeito do Brometo de Piridostigmina na modulação autonômica sobre o sistema imunológico. Observamos que os níveis de concentração de IFN- γ possuíam uma relação inversa ao processo inflamatório no tecido cardíaco. Em relação aos níveis de TNF- α , os quais tenderam a serem elevados nos animais infectados, e com o tratamento houve uma diminuição, embora essas diferenças não apresentaram significância estatística, um comportamento parecido foi observado. Em relação aos níveis de IL-10, observou-se um aumento significativo nos animais infectados, sem alteração com o tratamento. Esses dados em relação aos níveis de citocinas nos animais infectados concordam com estudos realizados recentemente por outros autores (De Melo e cols. 2012). Os dados apresentados em relação ao tratamento vão de acordo com trabalho realizado por Machado e cols, os quais observaram que o processo inflamatório e a carga parasitária no tecido cardíaco na fase aguda se relacionam diretamente com o balanço Th1/Th2 (Machado e cols, 2012).

Assim sendo, é possível confirmar o papel imunomodulatório no processo inflamatório característico da cardiopatia chagásica crônica. Esse processo é um dos fatores da patogênese da doença.

Segundo Nagajyothi (2012), a doença de Chagas crônica tem sido associada à persistência do parasita encontrado no tecido cardíaco e músculo liso de modelos experimentais e humanos. Também há evidências de parasitos no sangue de humanos e

animais infectados cronicamente, sem serem vistos em microscopia, sendo detectados por técnicas de PCR. Essa persistência do parasita na fase crônica, mesmo que seja em baixos níveis, é um fator importante da patogênese na fase crônica determinada, sendo que a resposta imune produzida pela baixa carga parasitária também está associada à fase crônica sintomática, com lesões graves, como no caso da cardiopatia (Nagajyothi e cols, 2012).

Geralmente os métodos parasitológicos para o diagnóstico da doença de Chagas crônica são de baixa sensibilidade, recomendando-se a utilização de técnicas mais refinadas que permitam a detecção do parasito ou seus antígenos, como o PAP, ou de seu DNA, como a PCR. Neste trabalho verificamos o parasitismo tecidual pelos dados fornecidos pela histologia, como presença de ninhos de amastigotas e/ou depósitos de antígenos e PCR. O parasito foi visualizado ocasionalmente (7.1%) por métodos diretos histológicos. Já pelas técnicas do PAP e da PCR observou-se que a maioria dos animais chagásicos tratados e não tratados apresentaram antígenos e DNA parasitários, o que confirma os resultados obtidos por outros pesquisadores. Contudo quando se realizou a técnica de PCR no sangue encontrou-se uma tendência a diminuição da positividade nos animais não tratados, porém não significativa. Estes dados sugerem a utilização de técnicas que permitam a quantificação do parasita, como a técnica de PCR em tempo real. Os resultados parasitológicos sugerem que o tratamento com o Brometo de Piridostigmina não seria eficaz no parasitismo.

Em frente à presença de infiltrado de células inflamatórias nos tecidos cardíacos com presença ou não do parasita, através das técnicas analisadas anteriormente, estimula a investigação nos mecanismos imunoregulatórios importantes no controle da infecção na fase crônica, o que afetaria provavelmente a morbidade da infecção. Segundo Gutierrez e cols (2009), a correlação positiva entre a inflamação e o parasitismo tecidual constitui evidência adicional que o *T. cruzi* é capaz de induzir diretamente danos no miocárdio levando a uma contribuição acumulativa de diversos mecanismos ativados desde o início da infecção, envolvendo todos os componentes da resposta imune, resposta regenerativa do tecido do miocárdio além da resposta fisiológica cardíaca. Os mecanismos imunológicos são o foco, uma vez que acreditam que a persistência do parasita no miocárdio é importante para ativar e manter o processo imunopatogênico, porém o desequilíbrio na homeostase imune poderia desencadear um fenômeno autoimune paralelo o qual amplifica a resposta imune, agravando a doença (Gutierrez e cols, 2009).

A característica da imunidade ao *T. cruzi* é complexa, mostrando uma relação importante entre a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ na resistência ao parasita e a gravidade da forma clínica, embora isso ainda não esteja claro. Alguns autores sugerem que a

capacidade do indivíduo em montar uma resposta imune Th1 pode estar associado ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica, embora haja controvérsias em outros estudos (Laucella e cols, 2004). Pacientes que tem a forma indeterminada da doença exibem um padrão inflamatório de células T produzindo IFN- γ , sugerindo que a gravidade da doença pode ser prevenida em vez de causada por uma resposta imune Th1. Durante a fase crônica pode ocorrer um aumento na produção das células T memória, indicando uma expansão clonal devido à estimulação antigênica continua pela persistência do parasita, além de indicar também a relação com o aumento da gravidade da doença (Laucella e cols, 2004; Fiuza e cols, 2009).

Diante do exposto acima e sabendo-se que as citocinas IFN- γ e IL-10 são as mais estudadas e destacadas na doença de Chagas crônica, percebe-se que ainda não está claro a função do IFN- γ na indução da patogênese na cardiopatia chagásica crônica. Porém neste trabalho discute-se que durante a infecção crônica pelo *T.cruzi* existe uma relação direta entre os níveis de IFN- γ e o processo inflamatório no tecido cardíaco, permitindo dizer que o aumento na síntese de citocinas pro-inflamatórias de acordo com a resposta voltada ao perfil Th1, está relacionado diretamente com a inflamação no miocárdio, e ainda sugere-se sua relação também com o parasitismo tecidual, este último devendo ser confirmado por técnicas quantitativas, como o PCR em tempo real. Também este trabalho correlaciona esse perfil Th1 ao processo de fibrose e hipertrofia cardíaca na cardiopatia chagásica, pois se percebeu a relação com os níveis de IFN- γ e o peso cardíaco, representando a hipertrofia. A cardiopatia chagásica crônica se mostra então originada pela associação da ativação da resposta imunológica do hospedeiro e pela presença do parasita no tecido cardíaco, mas sendo observado claramente o papel da resposta imune como o foco principal.

Assim nossos resultados apresentando um menor processo inflamatório, bem como diminuição no processo de fibrose e hipertrofia no grupo de animais tratados com Brometo de Piridostigmina, nos leva a pensar a respeito da integração entre as células do sistema imune e os cardiomiócitos com ênfase na função antiinflamatória da Ach, cujos possíveis mecanismos serão discutidos no tópico a seguir.

5.2 DISFUNÇÃO DO SISTEMA NERVOSO AUTONÔMICO NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

O acometimento do sistema nervoso autonômico é fato conhecido e mecanismos que levam à fisiopatologia na doença de Chagas tem sido objeto de pesquisa desde os estudos por Carlos Chagas e seus colaboradores. Existem muitas controvérsias, principalmente a respeito da cardiopatia chagásica crônica, a qual há a ocorrência de denervação cardíaca com função ventricular normal e ausência de sinais de insuficiência cardíaca (Souza & Marin-Neto, 1995).

A disfunção autonômica na doença de Chagas pode representar um exemplo de um distúrbio da homeostase tanto na fase aguda quanto na crônica expressa em diferentes formas e graus, afetando mecanismos de regulação neural, endócrino, cardiovascular, renal, imunológico e metabólico. Neste contexto, a caracterização do significado funcional e clínico da disfunção autonômica cardíaca chagásica é uma questão crítica. Os danos difusos quase sempre presentes em grau e extensão variável do sistema nervoso autonômico são uma característica patológica marcante das fases aguda e crônica de todas as formas da doença. São mostrados em vários estudos danos em diferentes componentes centrais e periféricos do sistema nervoso autonômico, principalmente relacionado ao coração e trato digestivo, incluindo estruturas neurais como os gânglios extrínsecos e intrínsecos periféricos, neurônios eferentes simpático e parassimpático, além de receptores celulares beta-adrenérgicos e muscarínicos colinérgicos. Na disfunção autonômica cardíaca há uma perda marcante de células ganglionares e neurônios no tecido cardíaco por lesões inflamatórias e degenerativas no nó sinusal, sendo essa estrutura a efetora da influência autonômica no coração. Essa disfunção pode assim gerar outros distúrbios e manifestações clínicas importantes no sistema cardiovascular, pois o SNA exerce efeitos modulatórios nas propriedades eletrofisiológicas do coração, como automatismo, condutibilidade e excitabilidade, condicionando ou predispondo a fatores na fisiopatogênese de algumas arritmias ou morte súbita. Dávila e cols sugerem que a disfunção parassimpática cardíaca na doença de Chagas é caracterizada por uma diminuição progressiva da influência vagal no nó sinusal, provavelmente secundária ao processo inflamatório crônico, destruição das fibras cardíacas, marcado processo de fibrose e a disfunção ventricular esquerda. Com isso começaram a pensar nas tentativas de antagonizar as disfunções através de terapias com inibidores da acetilcolinesterase para controlar esses sintomas de ativação neuro-hormonal (Dávila e cols, 1998; Marin-Neto, 1998; Junqueira Jr, 2006; Junqueira Jr, 2012).

Vários trabalhos têm relatado principalmente o comprometimento vagal cardíaco na doença de Chagas crônica correlacionando mecanismos auto-imune e inflamatório. Além do envolvimento cardíaco, lesões sistêmicas autonômicas também ocorrem com disfunção imunomodulatória e alterações nos mecanismos imunológicos. Isso poderia sugerir uma

contribuição da disfunção autonômica para o desenvolvimento e manutenção da doença de Chagas crônica, como foi demonstrado em diversos trabalhos que analisam as alterações nos níveis de citocinas e a infecção chagásica (Junqueira Jr, 2012). Assim pode-se também relacionar disfunção autonômica cardíaca crônica com a resposta imune, sugerido por Llaguno e cols, que mostraram o comprometimento do SNA como consequência de um processo inflamatório e degenerativo de grau e extensão variáveis, que evoluem desde um padrão agudo fibrótico até alterações nos gânglios e neurônios intrínsecos, nos quais podem ocorrer alterações simpáticas e/ou parassimpáticas correlacionados com a fisiopatologia da doença. O processo inflamatório caracterizado por presença de células T reativas estimuladas por uma resposta voltada ao perfil Th1, devido à persistência do parasitismo na fase crônica, sugere uma correlação entre as alterações imune e autonômica, que deveriam ser importantes no uso de marcadores prognósticos de risco cardiovascular (Llaguno e cols, 2011).

Assim, diante do exposto acima, neste trabalho foi observado uma associação entre os parâmetros analisados na HRV do iRR com os níveis séricos de citocinas, juntamente com o parâmetros eletrocardiográficos, uma vez que o SNA modula todas as propriedades eletrofisiológicas que influenciam as características elétricas e contráteis dos tecidos cardíacos. Isso relaciona a disfunção autonômica cardíaca com a resposta imune apresentada pelo modelo experimental de cardiopatia chagásica crônica no presente estudo.

Nossos resultados mostram um comprometimento simpático e principalmente vagal, com redução significativa dos componentes espectrais LF, VLF e HF respectivamente, no grupo Chg-NT, sendo confirmado ao apresentar uma importante redução do efeito vagal quando administrado atropina durante o bloqueio farmacológico. Esses resultados concordam em alguns aspectos com o trabalho realizado por Machado e cols na fase aguda da doença, o qual evidenciou uma diminuição no componente espectral HF e também do efeito vagal (Machado e cols, 2012), e também com resultados no trabalho de Llaguno (Llaguno e cols, 2011), o qual mostra uma diminuição da resposta simpática e um comprometimento vagal mais intenso na forma cardíaca da doença de Chagas crônica. Mas não podemos confirmar se essas alterações autonômicas estão relacionadas com uma diminuição no número de neurônios, pois não realizamos contagens dos mesmos. Através das alterações em todos os parâmetros eletrocardiográficos, podemos discutir como causa, o processo inflamatório, o parasitismo tecidual, e também a disfunção autonômica cardíaca, o que está de acordo com alguns trabalhos apresentados em literatura. Em nosso trabalho os grupos chagásicos apresentaram alterações autonômicas e altas concentrações de IFN- γ e IL-10, em relação aos grupos não infectados. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Llaguno e cols, o qual,

o grupo chagásico com a forma crônica cardíaca apresentou altas concentrações de IL-10, diminuição de IL-4 e baixas concentrações de IFN- γ em relação à forma indeterminada da doença de Chagas, ocorrendo uma correlação negativa da IL-10 com o componente espectral HF e do IFN- γ com LF/HF, também observado em nosso trabalho. De acordo com o mesmo autor, um aumento exacerbado nos níveis de IL-10 contribui para o escape e persistência do parasita, pois poderia inibir a síntese de IFN- γ , favorecendo o desenvolvimento da fisiopatologia da doença. Vários estudos têm mostrado o perfil de citocinas na forma cardíaca da doença de chagas crônica, e tem-se obtido resultados controversos. Segundo D'ávila e cols, os estudos tem falhado em estabelecer uma correlação entre o perfil da resposta imune e a forma clínica da doença, discutindo que indivíduos com cardiopatia chagásica crônica apresentam um desequilíbrio na resposta imune Th1, altos níveis de IFN- γ e IL-10, semelhantes a forma indeterminada da doença de Chagas (D'ávila e cols, 2009). Portanto o papel funcional do IFN- γ como responsável pela ativação de macrófagos e controle do parasita tem sido motivo de pesquisa e discussão, pois indivíduos com cardiopatia crônica e sintomática, com esse perfil de aumento nos níveis de IL-10 e baixa concentração nos níveis de IFN- γ , deveria atingir o estatus da regulação imune nessa forma clínica.

Nossos resultados apresentaram no 5º mês alterações significativas em quase todos os parâmetros eletrocardiográficos, dP, dQRS, iQTa e iQTc, sugerindo alterações no sistema de condução átrio-ventricular, disfunções intraventriculares e átrio-ventriculares, e no 6º mês alterações na dP, iPR, iQTa, iQTc e iRR, sugerindo também as mesmas disfunções citadas acima, que podem ser vistas em vários estudos, como visto por Ribeiro e cols (RIBEIRO e cols, 2009). Mas ao correlacionar estas alterações eletrocardiográficas com a disfunção autonômica podemos discutir que é improvável que a importante disfunção autonômica vista na forma cardíaca pode ser apenas um fenômeno secundário a uma disfunção ventricular mecânica. De acordo com Vasconcelos & Junqueira Jr em seu trabalho, observaram que a disfunção autonômica não é causalmente associada à disfunção ventricular, mas parece ser um fenômeno primário de forma isolada e podem ocorrer precedente a distúrbios ventriculares mecânicos, ou seja, não é uma consequência da alteração da cardiopatia chagásica crônica contrátil. Também foi visto por Ribeiro e cols que a presença de anormalidades marcantes no ECG não alterou a associação entre os índices vagais reduzidos (análises espectral de tempo e domínio) e a infecção pelo *T.cruzi*. As alterações eletrocardiográficas são usadas para identificar a presença de cardiopatia, existindo a evidência forte da existência de uma significativa disfunção ventricular esquerda como um poderoso marcador de excelente prognóstico (Ribeiro e cols, 2009; Vasconcelos & Junqueira Jr, 2012).

A disfunção ventricular pode ser relacionada à síntese de citocinas pró-inflamatórias. Nossos resultados mostram uma relação direta entre a disfunção ventricular, caracterizada pelas alterações eletrocardiográficas citadas acima, além da presença de hipertrofia (representada em conjunto pelo processo de fibrose) nos grupos chagásicos avaliados, com o direcionamento à resposta Th1, representada por um aumento significativo nos níveis de IFN- γ e uma tendência ao aumento de TNF- α . Isso corrobora com os resultados apresentados por Ferreira e cols, o qual correlacionou os níveis elevados de TNF- α e IFN- γ com a fração de ejeção ventricular esquerda, sendo visto uma relação inversa, indicando a associação entre a disfunção ventricular e resposta imune na cardiopatia chagásica (Ferreira e cols, 2003).

Sabendo-se da disfunção autonômica representada pelo comprometimento dos ramos simpáticos e principalmente do parassimpático, percebe-se em todos os aspectos da disfunção autonômica, a importância em manter a integridade do ramo parassimpático, para garantir adaptações funcionais cardíacas e a homeostase (Junqueira Jr, 2012).

5.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO VAGAL NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

O entendimento da imunidade tem emergido como o maior foco para os cientistas atualmente. O organismo faz uso de vias humorais e celulares através de comunicação intercelular pelas citocinas e outras moléculas regulatórias, e por contato célula-célula, onde são transmitidos pelos tecidos, com a finalidade de controlar a infecção e limitar danos ao hospedeiro, durante a resposta imune. Vários circuitos neuronais são ativados e mantém a homeostase durante a resposta imune, uma vez que a sinalização neural é rápida, direcional, regional e capaz de integrar diversos sistemas, como cardiovascular, pulmonar, e gastrointestinal, levando a um equilíbrio imune garantido pelo sistema nervoso. O reflexo inflamatório é um sistema de circuito neural que controla a imunidade inata, sendo ativada pela presença de citocinas e outros produtos inflamatórios nos tecidos infectados ou lesados. Assim ativa o arco aferente, que através de potenciais de ação viajam pelo nervo vago, chegando ao tronco cerebral, há integrações nos núcleos, e assim via descendente pelo nervo vago, é sinalizado através de potenciais de ação até o baço ou outros órgãos alvos produtores de citocinas. E por um mecanismo que envolve a liberação de Ach que atuam $\alpha 7$ -nAChRs de células do sistema imune, ativando vias de sinalizações intracelulares, com um bloqueio na síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, sem alterar a síntese de citocinas

antiinflamatórias (Tracey, 2009; Tracey, 2010; Tracey, 2012; Andersson & Tracey, 2012; Olofsson e cols, 2012).

Vários estudos têm mostrado o papel funcional da via antiinflamatória colinérgica nas doenças inflamatórias como sepse, doenças inflamatórias do intestino, artrite reumatóide, e recentemente até nas doenças que afetam o sistema nervoso central, como o Parkinson e Alzheimer, onde envolve os mecanismos pelo $\alpha 7$ -AChRs, com uma diminuição da resposta inflamatória e toxicidade. Nas doenças neurodegenerativas, estudos recentes (Kawamata & Shimohama, 2011) tem evidenciado que através do $\alpha 7$ -AChRs, há ativação de múltiplas vias celulares, como da PI3 K-AKT, JAK2/STAT3, que levam uma neuroproteção devido a inibição de neurotoxicidade, uma vez que inibe a NOS e assim a formação de NO, tendo uma perda menor de neurônios específicos em cada caso (Andersson & Tracey, 2012; Kawamata & Shimohama, 2011).

No estudo realizado por Maanen e cols, foi visto após vagotomia unilateral cervical em animais com artrite induzida por colágeno, uma inibição da via colinérgica antiinflamatória, representada por uma exacerbação da artrite, mostrando altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), presença de processo inflamatório exacerbado através da histologia e alto nível dos scores clínico e histológico. Ao ser administrado nicotina em água de beber ou injeção intraperitoneal de um agonista colinérgico específico para $\alpha 7$ -AChRs (AR-R17779), evidenciou uma redução no processo inflamatório nas articulações, atenuou os níveis de scores clínicos e histológicos, além de diminuir significativamente a expressão de TNF- α e IL-6. Esses resultados deixam claro o papel antiinflamatório da Ach associado a $\alpha 7$ -AChRs, inibindo a síntese e expressão de citocinas pró-inflamatórias (Maanen e cols, 2009; Tracey, 2009). Também Kojima e cols, em um modelo experimental com infecção induzida por LPS, os animais foram tratados com nicotina, estimulando farmacologicamente a via antiinflamatória colinérgica, e monitorados através de telemetria, a fim de avaliar as alterações sépticas em aspectos biocomportamentais como frequência cardíaca, pressão sanguínea, temperatura e atividade locomotora, não apenas por reduzir o perfil pro-inflamatório, mas também para manter a função do SNA como interação neuroimune. E assim ao demonstrarem que o tratamento com nicotina, houve a atenuação das alterações frequência cardíaca, pressão sanguínea, temperatura e atividade locomotora, indicando que a atividade autonômica não foi afetada pela administração do LPS, quando estimulada a via colinérgica. Sendo visto também através dos valores expressos pelos componentes espectrais HF, LF, que o grupo tratado com nicotina não apresentaram a diminuição significativa comparado aos grupos não tratados. Isso indica que o aumento das

freqüências dos componentes espectrais está relacionado com a atividade eferente vagal. Além do que a evidência da atenuação dos níveis de TNF- α e IL-1 β expresso no fígado, baço e soro confirmam a função da via colinérgica antiinflamatória (Kojima e cols,2011). Esses estudos podem ter contribuição para a descoberta de mecanismos e potencial terapêutico da via colinérgica antiinflamatório para atenuar alterações inflamatórias, sendo esse efeito explicado pelo reflexo inflamatório discutido por alguns autores como Tracey, em vários trabalhos, os quais confirmam a idéia de que agonistas colinérgicos como a nicotina, Ach, ou anticolinesterásicos, que levam direta ou indiretamente a um maior efeito vagomimético através do mecanismo associado ao $\alpha 7$ -AChRs, ativam vias de sinalização celulares que inibem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tendo não só o TNF- α uma importância significativa, mas também o IFN- γ , produzido pelas células do sistema imune (Tracey, 2002; Pavlov , 2008; Tracey, 2009; Kojima e cols,2011).

Um trabalho que merece destaque também é o de Pavlov e cols que avaliam a atividade colinérgica central, quando administram anticolinesterásicos seletivos e não seletivos, além de antagonista de receptor muscarínico central. Ao administrar o anticolinesterásico, há um aumento da biodisponibilidade da Ach central que regula a sinalização colinérgica modulando a via eferente vagal, inibindo a síntese de TNF- α e IL-6 sistêmicas (Pavlov e cols, 2011). Pode-se assim ver a integração e influência recíproca do sistema imune e nervoso, localmente ou a distância. Localmente, a resposta imune no SNC inclui ativação de células gliais e macrófagos, e infiltrado de células imunes circulantes, envolvendo os neurotransmissores na comunicação (Rosas-Ballina e cols, 2011, Trakhtenberg & Goldberg, 2011).

Nosso trabalho concorda com os autores anteriormente citados, uma vez que observamos o papel funcional da Ach como antiinflamatório, além de seu efeito autonômico no coração. Evidenciamos que o processo inflamatório, fibrose e hipertrofia foi atenuado com a administração do anticolinesterásico Brometo de Piridostigmina, que promove um aumento na biodisponibilidade de Ach atuando como antiinflamatório e confirmamos, ao dosar os níveis de citocinas, uma diminuição de IFN- γ , e tendência a diminuição de TNF- α , citocinas pró-inflamatórias, não interferindo na síntese de IL-10. A participação do IFN- γ e da IL-10 é muito importante na fase crônica, discutido anteriormente, concordando com os trabalhos de De Melo e cols e de Gutierrez, mas sugerindo que estudos falham em estabelecer essa correlação entre o perfil das citocinas e fase da doença cardíaca.

Na doença de Chagas crônica o processo de uma desnervação maior do parassimpático que do simpático e extremamente normal, e sabendo-se que o tônus vagal

influencia diretamente o HF e parcialmente o LF, discutimos o aumento significativo nas bandas espectrais VLF, LF e principalmente HF, no grupo tratado com Brometo de Piridostigmina em nosso trabalho. Isso indica que com o tratamento permitiu uma maior biodisponibilidade de Ach, que associado aos receptores colinérgicos atuam na função autonômica cardíaca, com uma maior influência do parassimpático sobre os parâmetros espectrais analisados. Esses aspectos estão de acordo com o trabalho de Pavlov, o qual apresentou um aumento da atividade da via vagal, com aumento do HF, ao ser estimulado com agonista colinérgico, e também uma diminuição da resposta pró-inflamatória. As interconexões entre núcleos autonômicos do tronco cerebral e estruturas do prosencéfalo constituem a rede autonômica central, que controlam pelo vago as funções viscerais (Pavlov e cols, 2006).

Como observado nesse trabalho, o papel funcional da Ach diretamente influencia a atividade autonômica no coração, expresso pela melhora eletrocardiográfica nos animais chagásicos tratados com o Brometo de Piridostigmina, o que poderia ser explicado pelo fato de que a desnervação parassimpática marcante nos animais não tratados afeta a função cronotrópica e inotrópica do coração. Com o tratamento, isso foi de certa forma revertida parcialmente, além de contribuir na melhora do perfil inflamatório. Esses achados relacionam-se e concordam com os resultados apresentados pelo trabalho de Machado e cols realizado na fase aguda (Machado e cols, 2012).

Finalizando, a disfunção autonômica pode ser uma causa primária do desequilíbrio do balanço Th1/Th2 nas doenças de caráter inflamatório, favorecendo o direcionamento da resposta Th1, desta maneira contribuindo na patogênese dessas doenças. Porém na doença de Chagas cardíaca crônica não é possível dizer se é causa ou consequência da inflamação característica da fisiopatologia da doença. Mas pode-se afirmar que a disfunção autonômica presente contribui de forma importante para o descontrole da resposta imune, e, por conseguinte da inflamação. E assim há uma relação direta entre o processo de disfunção autonômica e o perfil inflamatório, ou seja, quanto maior a disfunção vagal presente, maior o processo inflamatório. Além disso, a administração de anticolinesterásicos, e sua relação como potencial terapêutico frente a doenças antiinflamatórias, torna-se alvo de pesquisas nas áreas de farmacologia e de fisiologia para a compreensão da fisiopatogênese das doenças como a doença de Chagas crônica.

Diante dos resultados discutidos expostos em todo trabalho podemos concluir que o tratamento crônico com Brometo de Piridostigmina em camundongos chagásicos crônicos promoveu pela estimulação da via colinérgica uma resposta neuroimuno-modulatória importante do SNA parassimpático sobre o perfil inflamatório da miocardite chagásica. Este estudo mostrou uma alteração do balanço Th1/Th2 na fase crônica da doença de Chagas, no qual houve uma resposta de redução do perfil Th1 característico, sem alterar o perfil Th2, confirmado pela quantificação das citocinas IFN- γ e IL-10.

Portanto podemos confirmar o papel funcional do SNA parassimpático na fisiopatologia durante a fase crônica da doença, e enfatizar a influência da teoria neuroimunogênica na doença de Chagas.

Alves MJM, Moratara RA. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells?. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 76-88, 2009.

Andersson U & Tracey KJ. Reflex Principles of Immunological Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 2012. 30:313–35.

Andersson U & Tracey KJ. J. Neural reflexes in inflammation and immunity. *Exp. Med.* 2012. Vol. 209 No. 6 1057-1068

Antel J, Birnbaumg, Artung HP, Vicent A. *Clinical Neuroimmunology*. 2^a ed, 2005.

Bear MF, Connors BW, Paradiso, MA. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 3^a ed. São Paulo: Artmed, 2008.

Bestetti RB; Soares EG; Sales-Neto VN; De Araujo RC; Oliveira JS. The resting electrocardiogram of *T. cruzi*-infected rats. *Rev. Inst. Med. Trop*, São Paulo, 1987; 29(4):224-9.

Bestetti RB; Oliveira JS. The significance of electrocardiographic study in experimental Chagas cardiopathy in rats. *Arq Bras Cardiol* 1988; 51(2):131-4.

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

Castro RR, Porphirio G, Serra SM, Nobrega AC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine protects against exercise induced myocardial ischaemia. *Heart* 2004;90:1119e23.

Chapadeiro E, Silva E L, Silva ACM, Fernandes P, Ramirez LE. Despopulação neuronal cardíaca em hamsters (*Mesocricetus auratus*) cronicamente infectados com o *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. vol.32 n.1 Uberaba Jan./Feb. 1999.

Cobb D, Hambright D, Smeltz RB (2010). T-bet-independent effects of IL-12 family cytokines on regulation of Th17 responses to experimental *T. cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 88, 965-971.

Corrêa- Oliveira R, Gomes JAS, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Filho OAM, Costa MOR, Gazinelli G, Bahia-Oliveira LMG. The Role of the Immune Response on the Development of Severe Clinical Forms of Human Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 94, Suppl. I: 253-255. Rio de Janeiro, 1999

Coura JR. Tripanossomíase, Doença de Chagas. *Cienc. Cult.* vol.55 no.1 São Paulo Jan./Mar 2003.

Coura JR. Origem, determinantes e morbidade da Doença de Chagas. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud. Universidad de Carabobo.* - Vol. 11, Supl. N° 1 Valencia, Venezuela. Diciembre 2007.

Cunha-Neto E, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' heart disease. *Sao Paulo Medical Journal*. vol.113 no.2 São Paulo Mar./Apr. 1995

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.104 supl.1 Rio de Janeiro July 2009.

Cutrullis RA e cols. Immunomodulatory and anti-fibrotic effects of Ganglioside therapy on the chronic form of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *International Immunopharmacology* 11(2011) 1024-1031.

D'ávila DA e cols. Immunological imbalance between IFN- γ and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(1): 100-105, February 2009.

De Melo AS e cols. IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine* 58 (2012) 207–212

Dias JCP. O Tratamento Específico na Doença de Chagas. Conferencia Nacional de Saúde on line. Ministério da Saude: Fundação Oswaldo Cruz-Centro de Pesquisa René Rachou. Belo Horizonte, 1999.

Elenkov IJ; Papanicolau DA; Wilder RL; Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: Clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians*, 108: 374-381, 1996.

Ferreira RC e cols. Increased Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- α in Asymptomatic/“Indeterminate” and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 98(3): 407-411, April 2003.

Fiuza JA e cols. Profile of Central and Effector Memory T Cells in the Progression of Chronic Human Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 3(9): e512, 2009.

Gutierrez FRS, et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, 2009, 31, 673–685.

Hoyer D, Maestri R, La Rovere MT, Pinna DG. Autonomic response to cardiac dysfunction in chronic heart failure: a risk predictor based on autonomic information flow. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008;31:214e20.

Hunston JM & Tracey KJ. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *Journal of International Medicine*, 1365-2796, 2010.

Ianni BM, Mady C. Terapêutica da Forma Crônica da Doença de Chagas. É Eficaz o Tratamento Etiológico? *Arquivos Brasileiro de Cardiologia*. vol.70 n.1 São Paulo Jan. 1998.

Junqueira Jr LF. A summary perspective on the clinical-functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39 (Suplemento III): 64-69, 2006.

Junqueira Jr LF. Insights into the clinical and functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(2):243-252, mar-abr, 2012.

Kawata J & Shimohama S. Multiple Pathways Attenuating Cytotoxicity in Models of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease* 24 Suppl 2: 95–109(2011).

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

Laranja FS; Dias E; Nóbrega G; Miranda A. Chagas' disease: a clinical, epidemiological and pathologic study. *Circulation*, 14:1034-1059, 1956.

Llewellyn-Smith I & Verben AJM. *Central Regulation of Autonomic Functions*. 2^a ed: Oxford University Press, Inc.2011.

Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, et al. Frequency of Interferon- gamma -producing T cells specific for Trypanosomacruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 189: 909–918, 2004.

Lima RS, Soares MBP, Santos RR. Cell therapy in Chagas' disease. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. vol.31 supl.1 São Paulo May 2009 Epub June 05, 2009.

Machado MPR e cols. Autonomic nervous system modulation affects the inflammatory immune response in mice with acute Chagas disease. *Experimental Physiology*, 2012.

Machado MPR & Dias da Silva VJ. Autonômico Neuroimmunomodulation in Chagasic Cardiomyopathy. *Experimental Physiology*, 2012.

Maisel AS e cols. A new method for isolation of human lymphocytes subsets reveals differential regulation of beta adrenergic receptors by terbutaline treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 46: 429-439, 1989.

MALLIANI A. *Principles of Cardiovascular Neural Regulation in Health and Disease*. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2000.

Marques DSO, Canesin MF, Barutta Jr F, Fuganti CJ, Baretto ACP. Avaliação de pacientes assintomáticos com forma crônica da doença de Chagas através da análise do eletrocardiograma dinâmico, ecocardiograma e do peptídeo natriurético tipo B. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. vol.86 no.3 São Paulo Sept. 2006.

Matsuda A, et al. Novel Therapeutic targets for Sepsis: Regulation Exaggerated Inflammatory Responses. *J Nippon Med Sch* 2012: 79(1).

Medei EH, Nascimento JHM, Pedrosa RC, Carvalho ACC. Envolvimento de auto-anticorpos na fisiopatologia da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiro de Cardiologia*. vol.91 no.4 São Paulo Oct. 2008.

Morris SA; Tanowitz HB; Wittner M; Bilezikian JP. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation*, v82, p 1900-1909.1990.

Mosovich SE, Mady C, Lopez N, Ianni B, Dias JCP, Corrêa D, Farhkouh ME. Chagas disease as a mechanistic model for testing a novel hypothesis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. vol.41 no.1 Uberaba Jan./Feb. 2008

Nagajyothi F & Machado FS e cols. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* Persistence in Chagas Disease.

Olofsson PS e cols. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunological Reviews* 248/2012.

Pavlov VA e cols. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *PNAS*. vol. 103:13, 5219–5223, 2006 .

Pavlov VA. Cholinergic Modulation of Inflammation. *Int. J. Clin. Exp Med*. Vol11, 203-212.2008.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *Lancet Infect. Dis*. 1: 92-100, 2001.

Perez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, Botasso O. *Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease*. *J Neuroimmunol*. 235, 84-90, 2011.

Radojcic T e cols. Changes in beta adrenergic receptor distribution on immunocytes during differentiation: An analysis of T cells and macrophages. *J Neurosci Res*, 30:328-335, , 1991

Ribeiro ALP, Rocha MOC. Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev. Soc. Bras.Med.Trop*. vol.31 n.3 Uberaba May/June 1998.

Ribeiro ALP e cols. Vagal impairment in elderly Chagas disease patients: A population-based study (The Bambuí Study). *International Journal of Cardiology*. 2009.

Ribeiro AL, De Carvalho AC, Lombardi F, Talvani A, Teixeira MM, Rocha MO. In vivo inhibitory effect of anti-muscarinic autoantibodies on the parasympathetic function in Chagas disease. *Int J Cardiol*. 145, 339-340, 2010.

Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ . Acetylcholine- synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*. 334, 98-101, 2011.

Sanders VM. The role of norepinephrine and beta-2-adrenergic receptors stimulation in the modulation of Th1,Th2, and B lymphocyte function. *Adv Exp Med Biol*, 437:269-278, 1998.

Santos-Buch, C. A.; Teixeira, A. R. L. Immunology of experimental Chagas' disease: III. Rejection of allogenic heart cell in vitro. *J. Exp. Med.*, 140: 398-402, 1988.

Serra SM, Costa RV, Castro RRT, Xavier S, Nobrega ACL. Cholinergic Stimulation Improves Autonomic and Hemodynamic Profile During Dynamic Exercise in Patients With Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure* Vol. 15 n°. 2 2009

Soares MBP, Santos RR. Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 325-332, 2009.

Souza A & Marin-Neto JA. Functional alterations of the autonomic nervous system in Chagas' heart disease. *São Paulo Medical Journal/RPM* 113(2) *Marl* Apr 1995.

Storino R & Milei J. *Enfermidad de Chagas*. Ed:Dayma Argentina, 1994.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY IN NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING ELECTROPHYSIOLOGY: heart rate variability: Standards of measurement , Physiological interpretation , and Clinical Use. *Circulation*, 93:1043-1065, 1996

Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 24, 592-630.

Tostes Jr S, Rocha-Rodrigues DB, Pereira GA, Rodrigues Jr V. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *International Journal of Cardiology* vol. 99 n.2. p 233-237. March 2005.

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. Vol.420.19/26. December 2002.

Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 117:289–296 2007.

Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 9, 418-428.2009

Tracey KJ. Understanding immunity requires more than immunology. *Nature Immunology*.Vol 11, n° 7, July 2010.

Tracey KJ. Immune Cells Exploit a Neural Circuit to Enter the CNS. *Cell* 148, February 3, 2012.

Trakhtenberg EF & Goldberg J. Neuroimmune Communication. *Science Immunology* . Vol 33, n° 1, 2011.

Vila-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, Pinho-Filho JA, Mota A, Almeida AJG, Carvalho C, Carvalho HG, Oliveira AD, Santos RR. Transplante de células de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária á doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. vol.82 no.2 São Paulo Feb. 2004

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública* vol.16 suppl.2 Rio de Janeiro 2000.

Waghabi M. Fibrose Cardíaca Chagásica. Fundação Oswaldo Cruz. *Ministério da Saúde*. Rio de Janeiro, 2009.

Wilder RL. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 307-338.

Zimerman LI, Liberman A, Castro RRT, Ribeiro JP, Nóbrega ACL. Acute electrophysiologic consequences of pyridostigmine inhibition of cholinesterase in humans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43: 211-216, 2010.

Foram avaliados os scores inflamatório de todas as regiões dos corações de camundongos controles (não infectados) tratados (Con-NT) e não tratados (Con-Pirido) e infectados pelo *T. cruzi* tratados (Chg-NT) e não tratados (Chg-Pirido).

Nos átrios foram vistos em 75% dos animais Chg-NT um infiltrado inflamatório discreto e 25% desses animais um infiltrado inflamatório leve. No grupo Chg-Pirido, 6,3% dos animais apresentaram um infiltrado inflamatório discreto, 18,8% um infiltrado inflamatório leve, 18,8 % infiltrado inflamatório muito leve e 56,1% ausência de processo inflamatório. No grupo Con-NT 7,7% dos animais apresentaram infiltrado inflamatório muito leve e 93,3% ausência de infiltrado inflamatório, enquanto que os animais Con-Pirido mostraram 20% de infiltrado inflamatório muito leve e 80% ausência de inflamação (Apêndice A).

Nos ventrículos foram achados no grupo Chg-Cont 42% dos animais um processo inflamatório discreto e 58% um processo inflamatório leve. Já no grupo Chg-Pirido foi encontrado 31,25% um infiltrado inflamatório leve, 50% leve e 18,75% dos animais um infiltrado inflamatório caracterizado como muito leve, e 18,75% ausência de inflamação. 42% dos animais do grupo Chg-Pirido evidenciaram miocardite discreta e 58% uma miocardite leve. Já 7,7% dos animais do grupo WT-Cont apresentaram miocardite muito leve e 92,3% desses animais apresentaram ausência de inflamação, enquanto que no grupo WT-Pirido 100% mostraram ausência de inflamação (Apêndice B).

Na junção atrioventricular, o grupo Chg-Cont, 33% dos animais apresentaram miocardite discreta e 67% miocardite leve. No grupo Chg-Pirido 18,8% dos animais evidenciaram infiltrado inflamatório leve, 6,3% mostrou infiltrado inflamatório muito leve e 74,9% ausência de infiltrado inflamatório. Enquanto que nos grupos WT-Cont e WT-Pirido evidenciaram 100% ausência de processo inflamatório (Apêndice C).

No Pericárdio, o grupo Chg-Cont evidenciou 83% dos animais com um infiltrado inflamatório leve e 17% infiltrado inflamatório muito leve, já no grupo Chg-Pirido 6,25% dos animais apresentaram infiltrado inflamatório caracterizado por discreto, 12,5% leve e 81,25% ausência de inflamação. E nos grupos WT-Cont e WT-Pirido mostraram 100% ausência de infiltrado inflamatório (Apêndice D).

Apêndice A: Valores de scores inflamatório para os átrios de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-Cont) e coletados 6° mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (WT-Cont e WT-Pirido).

	WT-Con (n=13)	WT-Pirido (n=10)	Chg-Con (n=12)	Chg-Pirido (n=16)
	-/+	-/+	+	+
	-	-	+	+/-
	-	-	+/-	+/-
	-	-	+	-/+
	-	-	+	+/-
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+	-
	-	-/+	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+	-
	-	-	+/-	-
	-	-		-
	-	-		-
	-	-		-/+
mediana	-	-	+ ^{*&}	-
percentil25%	-	-	+	-
percentil75%	-	-	+	-/+

(- = ausência de infiltrado; -/+ = infiltrado discretíssimo; +/- = infiltrado pouco discreto; + = infiltrado discreto)

* p < 0,001 versus WT-Cont e & p < 0,001 versus Chg-Pirido (teste de Mann-Whitney)

No epicárdico, o grupo Chg-Con apresentaram 92% infiltrado inflamatório discreto e 8% leve; o grupo Chg-Pirido apresentaram 50% dos animais infiltrado inflamatório leve e 50% ausência, no grupo WT-Con apresentaram 7,7% dos animais infiltrado inflamatório muito leve e 93,3% ausência, e o grupo WT-Pirido mostraram 10% de infiltrado inflamatório muito leve e 90% dos animais ausência de infiltrado inflamatório (Apêndice E).

Já nos gânglios foram encontrados no grupo Chg-Cont 83% dos animais infiltrado inflamatório caracterizado como discreto e 17% desses animais não foi encontrado presença de infiltrado inflamatório. No grupo Chg-Pirido foi encontrado 6,25% um infiltrado inflamatório discreto e 93,75% ausência de infiltrado inflamatório. E no grupo WT-Cont 100% apresentaram ausência de inflamação, enquanto no grupo WT-Pirido 10% mostraram evidencia de infiltrado inflamatório muito leve e 90% ausência de infiltrado inflamatório (Apêndice F).

Também foram evidenciados infiltrados inflamatório nos nervos: no grupo Chg-Con 17% dos animais apresentaram um infiltrado inflamatório discreto e 83% dos animais apresentaram ausência de infiltrado inflamatório. Nos grupos Chg-Pirido, WT-Con e WT-Pirido 100% apresentaram ausência de infiltrado inflamatório (Apêndice G).

Apêndice E: Valores de scores inflamatório para o epicárdio de camundongos C57Bl/6j tratados com brometo de piridostigmina (Chg-Pirido) ou não (Chg-Cont) e coletados 6º mês depois da inoculação com *T. cruzi* (Chg) ou com veículo (WT-Cont e WT-Pirido).

	WT-Cont (n=13)	WT-Pirido (n=10)	Chg-Cont (n=12)	Chg-Pirido (n=16)
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+/-	-/+
	-	-	-/+	-
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+/-	-
	-	-	+/-	-/+
	-	-	+/-	-/+
	-	-/+	+/-	-/+
	-	-	+/-	-
	-/+	-	+/-	-
	-		+/-	-
	-		+/-	-
	-			-
				-
				-/+
				-/+
mediana	-	-	+/-*&	-#
percentil25%	-	-	+/-	-
percentil75%	-	-	+/-	-/+

(- = ausência de infiltrado; -/+ = infiltrado discretíssimo; +/- = infiltrado pouco discreto; + = infiltrado discreto)

* p < 0,001 versus WT-Cont e & p < 0,001 versus Chg-Pirido # p < 0,001 versus WT-Con (teste de Mann-Whitney)

