



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BRUNO FERNANDO CRUZ LUCCHETTI

**TREINAMENTO FÍSICO MODULA A PRODUÇÃO DE ÓXIDO  
NÍTRICO E DE CITOCINAS MELHORANDO A RESPOSTA  
CARDIOVASCULAR E RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR  
*Trypanosoma cruzi***

BRUNO FERNANDO CRUZ LUCCHETTI

**TREINAMENTO FÍSICO MODULA A PRODUÇÃO DE ÓXIDO  
NÍTRICO E DE CITOCINAS MELHORANDO A RESPOSTA  
CARDIOVASCULAR E RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR  
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Patologia Experimental da  
Universidade Estadual de Londrina como  
requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Marli Cardoso Martins  
Pinge

Co-Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho

Londrina  
2016

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L934t	<p>Lucchetti, Bruno Fernando Cruz. treinamento físico modula a produção de óxido nítrico e de citocinas melhorando a resposta cardiovascular e resistência à infecção por Trypanosoma cruzi / Bruno Fernando Cruz Lucchetti. - Londrina, 2016. 70 f. : il.</p> <p>Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge. Coorientador: Phileo Pinge Filho. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.</p> <p>1. Exercício Físico - Teses. 2. Trypanosoma cruzi - Teses. 3. Imunologia - Teses. 4. Fisiopatologia cardiovascular - Teses. I. Cardoso Martins Pinge, Marli . II. Pinge Filho, Phileo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de pós-graduação em patologia experimental. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616-092</p>
-------	--

BRUNO FERNANDO CRUZ LUCCHETTI

**TREINAMENTO FÍSICO MODULA A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO  
E DE CITOCINAS MELHORANDO A RESPOSTA CARDIOVASCULAR  
E RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Cardoso  
Martins Pinge  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziela Sciantti Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de Fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho, bem como todas as minhas demais conquistas, a minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marli Cardoso Martins Pinge, por me receber e compartilhar do seu vasto conhecimento. Agradeço imensamente o apoio e a confiança, tenho orgulho em dizer que um dia fui seu orientado.

Agradeço ao meu co-orientador Prof Dr Phileo Pinge Filho, pelo todo o apoio, incentivo e o seu amor pela pesquisa que cativa a todos em sua volta, um exemplo como pessoa e pesquisador.

Agradeço aos meus pais, Adevair Aparecido Lucchetti e Maria Cristina Cruz Lucchetti, e minha irmã Renata Cruz Lucchetti, por toda confiança depositada em mim, por serem meu porto seguro em momentos de dificuldades, sempre me incentivando a seguir lutando pelos meus sonhos.

Agradeço a minha namorada Natália Isabelle Macedo, por tudo o que você transformou na minha vida. Obrigado pelo teu carinho, tua alegria, tua atenção, tua vibração com as minhas conquistas e teu ombro em cada momento difícil que você ajudou a atravessar. Sem você, essa conquista não teria o mesmo gosto. Obrigado meu amor. Te amo.

Agradeço este trabalho à todos os amigos de laboratório, primeiramente à Hiviny de Ataides Raquel, pela sua paciência e sabedoria, e por não medir esforços para me ajudar na elaboração do protocolo de atividade física. Agradeço também a minhas amigas Nágela Ghabdan Zanluqui e Isabel Lovo Martins, companheiras sempre dispostas a ajudar, vocês foram fundamentais nesses dois anos de trabalho, desde os pequenos até os grandes problemas. Não menos importante a todos os companheiros de laboratórios que sempre tiveram a disposição para ajudar em todos os momentos, vocês fizeram parte da minha formação e vão estar sempre presentes em minha vida com certeza.

Agradeço também aos meus amigos do curso de pós-graduação pelo convívio com quem tanto aprendi durante as disciplinas, principalmente a Mônica Belém e Juliano Oda que sempre estiveram presentes desde o primeiro dia de aula, e contribuíram muito para o meu desenvolvimento e aprendizado durante todo o mestrado.

Agradeço a todos meus amigos que torceram por mim, para que eu concluísse com êxito esse desafio.

Agradeço aos professores Dr. Eduardo José de Almeida Araújo e Dr<sup>a</sup>. Graziela Scaliante Ceravolo por terem aceitado participar de minha banca.

Agradeço aos camundongos utilizados neste estudo, parte fundamental desse trabalho, obrigada pela suas contribuições à ciência.

“Seu trabalho vai preencher uma boa parte da sua vida e a única maneira de ser verdadeiramente satisfeito é fazer o que acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é amar o que você faz.”

-Steve Jobs

LUCCHETTI, Bruno Fernando Cruz. **Treinamento físico modula a produção de óxido nítrico e de citocinas melhorando a resposta cardiovascular e resistência à infecção por *Trypanosoma cruzi***: treinamento físico prévio à infecção por *T. cruzi*. 2016. 70 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* provoca resposta imunológica inata iniciada na fase aguda responsável pela resistência do hospedeiro ao parasito. Observa-se inflamação cardíaca progressiva, fibrose com modificações na arquitetura e funcionalidade do coração. Recentes estudos têm mostrado que atividade física (AF) crônica de intensidade moderada pode atuar como um fator de resistência contra infecção por *T. cruzi* em animais. No entanto, os parâmetros cardiovasculares de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), e níveis de óxido nítrico (NO) que acompanham a fase aguda da infecção em animais previamente treinados, não estão esclarecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do condicionamento físico prévio sobre aspectos inflamatórios, bioquímicos e cardiovasculares da resistência à infecção por *Trypanosoma cruzi*. Camundongos Swiss foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Controle e sedentário (CS), controle e treinado (CT), sedentário e infectado (SI), e treinados e infectado (TI). A atividade física foi realizada em esteira por nove semanas. Após a AF, os camundongos foram infectados com  $5 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Observamos bradicardia de repouso e melhor desempenho nos animais treinados em comparação com os sedentários. No 20º dia pós-infecção (dpi), encontramos uma diminuição da FC no SI comparado com animais TI ( $699,73 \pm 42,37$  vs  $742,11 \pm 25,35$  bpm,  $p < 0,05$ ). Observou-se também aumento da produção de NO, no tecido cardíaco no 20º dpi em SI, e normalizado no grupo TI ( $20,73 \pm 2,74$  vs.  $6,51 \pm 1,19$  mM). Um aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,) e MCP-1 foi encontrado no grupo SI, comparado com o TI. Ocorreu um aumento da parasitemia nos dias 15 e 17 pós infecção no grupo SI, já no grupo TI esse aumento foi atenuado. Além disso, animais TI mostraram aumento da sobrevivência em comparação com SI. Nossos resultados sugerem que a AF prévia, desempenha um papel preventivo na resistência à infecção por *T. cruzi*, modulando a resposta inflamatória e níveis de NO de camundongos infectados.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas. Inflamação. Pressão arterial. Frequência cardíaca.

LUCCHETTI, Bruno Fernando Cruz. **Physical training modulates nitric oxide production and cytokine improving cardiovascular response and resistance to infection to *Trypanosoma cruzi***: Exercise Training Previous to Infection with *T. cruzi*. 2016. 70 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

The *trypanosoma cruzi* infection causes innate immune response initiated in the acute phase responsible for host resistance to the parasite. It is observed progressive heart inflammation, fibrosis with changes in the architecture and functionality of the heart. Recent studies have shown that chronic physical activity (PA) of moderate intensity can act as a resistance factor against *t. cruzi* infection in animals. However, the cardiovascular parameters of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR), and nitric oxide levels (NO) accompanying the acute phase of infection in animals previously trained, are not clear. The aim of this study was to evaluate the effects of previous physical conditioning on inflammatory, cardiovascular and biochemical aspects of resistance to infection by *Trypanosoma cruzi*. Swiss mice were randomized into four groups: control sedentary (CS), control trained (CT), sedentary infected (SI), and trained infected (TI). Physical activity was performed on a treadmill for nine weeks. After exercise training mice were infected with  $5 \times 10^3$  trypomastigotes of *t. Cruzi* ( $\gamma$  strain). We observe resting bradycardia and better performance in trained animals compared to sedentary. On the 20th day post-infection (dpi), we found a decrease in heart rate in SI compared with TI animals ( $699.73 \pm 42.37$  vs  $742.11 \pm 25.35$  bpm,  $p < 0.05$ ). There was also an increase in NO production in heart tissue in 20 dpi in SI, and normalized in the TI group ( $20.73 \pm 2.74$  vs.  $6.51 \pm 1.19$  mm). An increase in the plasma concentration of pro-inflammatory cytokines (il-12, tnf- $\alpha$ , ifn- $\gamma$ ,) and mcp-1 was found in the SI group, compared to TI. An increase in parasitaemia in 15 and 17 dpi in the SI group, since the TI group this increase was attenuated. In addition, TI animals showed increased survival compared to the SI. Our results suggest that previous PA plays a preventive role in resistance to infection by *t. Cruzi*, modulating the inflammatory response and NO levels in infected mice.

**Keywords:** Chagas disease. Inflammation. Arterial pressure. Heart rate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estimativa de imigrantes infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> em países não endêmicos .....	14
<b>Figura 2</b> – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no inseto vetor e no hospedeiro humano.....	15
<b>Figura 3</b> – Formação do óxido nítrico a partir o metabolismo da L-Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase .....	20
<b>Figura 4</b> – Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção. ....	21
<b>Figura 5</b> – Running speed of Swiss mice .....	60
<b>Figure 6</b> – Cardiovascular parameters during exercise training .....	61
<b>Figura 7</b> – Effect of treadmill exercises on course of <i>T. cruzi</i> infection.....	62
<b>Figura 8</b> – Treadmill exercises control parasite proliferation in the heart .....	63
<b>Figura 9</b> – Treadmill exercise decreases <i>T. cruzi</i> -induced heart pathology.....	64
<b>Figura 10</b> – Effect of exercise training on cardiovascular parameters after infection.....	65
<b>Figura 11</b> – Treadmill exercise modulates nitric oxide production .....	66
<b>Figura 12</b> – Effect of treadmill exercises on proinflammatory cytokines in infected mice .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL3	Quimiocina da família CC ligante 3
CCL5	Quimiocina da família CC ligante 5
DC	Doença de Chagas
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
IL-10	Interleucina do tipo 10
IL-12	Interleucina do tipo 12
IL-17	Interleucina do tipo 17
IL-1 $\beta$	Interleucina do tipo 1- $\beta$
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos – 1
NK	“Natural Killer”
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
TCD4+	Linfócito T auxiliar
TCD8+	Linfócito T citotóxico
TGF- $\beta$	Fator transformador do crescimento- $\beta$
Th1	Linfócito T auxiliar produtor de citocinas do padrão 1
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
phox KO	Animais deficientes para NADPH oxidase
VO <sub>2</sub> Max	Consumo Máximo de Oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	13
1.2	CICLO DE VIDA DO <i>T. CRUZI</i> .....	14
1.3	FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS .....	16
1.4	SISTEMA IMUNOLÓGICO NA INFECÇÃO POR <i>T.CRUZI</i> .....	16
1.5	FORMA CARDÍACA DA DOENÇA DE CHAGAS .....	18
1.6	ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	19
1.7	RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE FÍSICA, SISTEMA IMUNOLÓGICO E DOENÇA DE CHAGAS .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	27
3.1	ANIMAIS .....	27
3.2	MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES .....	27
3.3	PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO .....	28
3.4	INFECÇÃO .....	29
3.5	PARASITEMIA E SOBREVIDA .....	29
3.6	OBTENÇÃO DO PLASMA .....	29
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE NO .....	30
3.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	31
3.9	QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS .....	31
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33
<b>4</b>	<b>ARTIGO SUBMETIDO AO PLOS ONE</b> .....	40
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68

<b>6</b>	<b>ELEMENTOS PÓS TEXTUAIS.....</b>	<b>69</b>
6.1	CARTA SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	69
6.2	PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	70

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, que foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879–1934) em 1909. Ele descreveu o primeiro caso humano da DC (CHAGAS, 1909), no entanto sabe-se que esta infecção é muito mais antiga, pois foi encontrado DNA de *T. cruzi* em múmias colombianas com mais de 9.000 anos (RASSI, RASSI *et al.*, 2012).

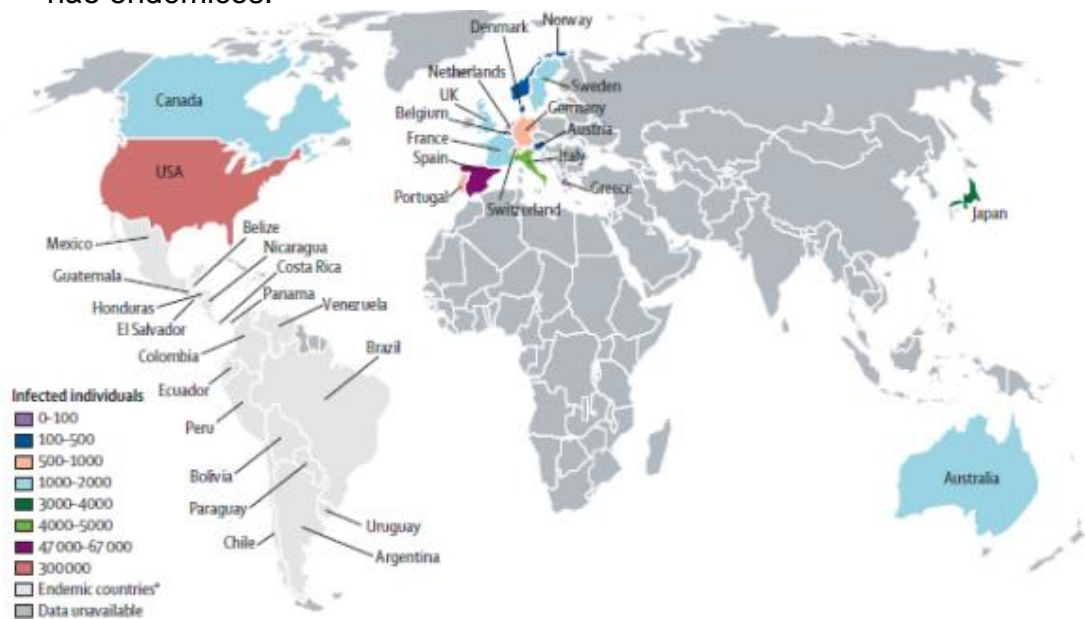
A maior incidência da DC está localizada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da América Latina, estendendo-se até as regiões do sudeste dos Estados Unidos da América (DIAS, 2006). É considerada a maior causa de mortalidade e morbidade por doenças infecciosas na América Latina, onde afeta a economia desses países, condições sociais e de trabalho dos pacientes acometidos por esta patologia (MUNOZ-SARAVIA, HABERLAND *et al.*, 2012).

A DC era considerada uma endemia predominantemente rural, de distribuição exclusiva das Américas do Sul e Central, localizada em áreas específicas, muito relacionada ao subdesenvolvimento social e econômico (SCHMUNIS, 2007). O processo migratório para áreas urbanas durante os últimos 30 anos do século XX mudou este padrão epidemiológico, tornando então a DC uma endemia urbana. Nos últimos anos problemas econômicos e políticos nos países considerados endêmicos, estimularam a migração e favoreceram a propagação da doença para os países desenvolvidos (PIRON, VERGES *et al.*, 2008). Atualmente a DC é considerada um problema de saúde pública mundial, com vários casos notificados em vários países não endêmicos, como Espanha e Estados Unidos (Figura 1), dentre outros destinos dos imigrantes latinos (RASSI, RASSI *et al.*, 2010). É estimado que o número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo seja de 6 a 7 milhões (WHO, 2015) e 75 a 90 milhões de pessoas residam em áreas consideradas endêmicas, e se encontram em risco real para infecção (COURA e DIAS, 2009).

A transmissão para o ser humano e para mais de 140 espécies de mamíferos domésticos e selvagens ocorre principalmente por grandes insetos hematófagos do Filo *Arthropoda*, Subfilo *Hexapoda*, Ordem *Hemiptera*, Família *Reduviidae* e Subfamília *Triatominae* (GORLA D, 2010). A transmissão também

pode ocorrer por outros mecanismos não dependentes do vetor, como em transfusões de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita e também em acidentes de laboratórios (RASSI, RASSI *et al.*, 2010).

**Figura 1** – Estimativa de imigrantes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em países não endêmicos.



Fonte: (RASSI, RASSI *et al.*; 2010)

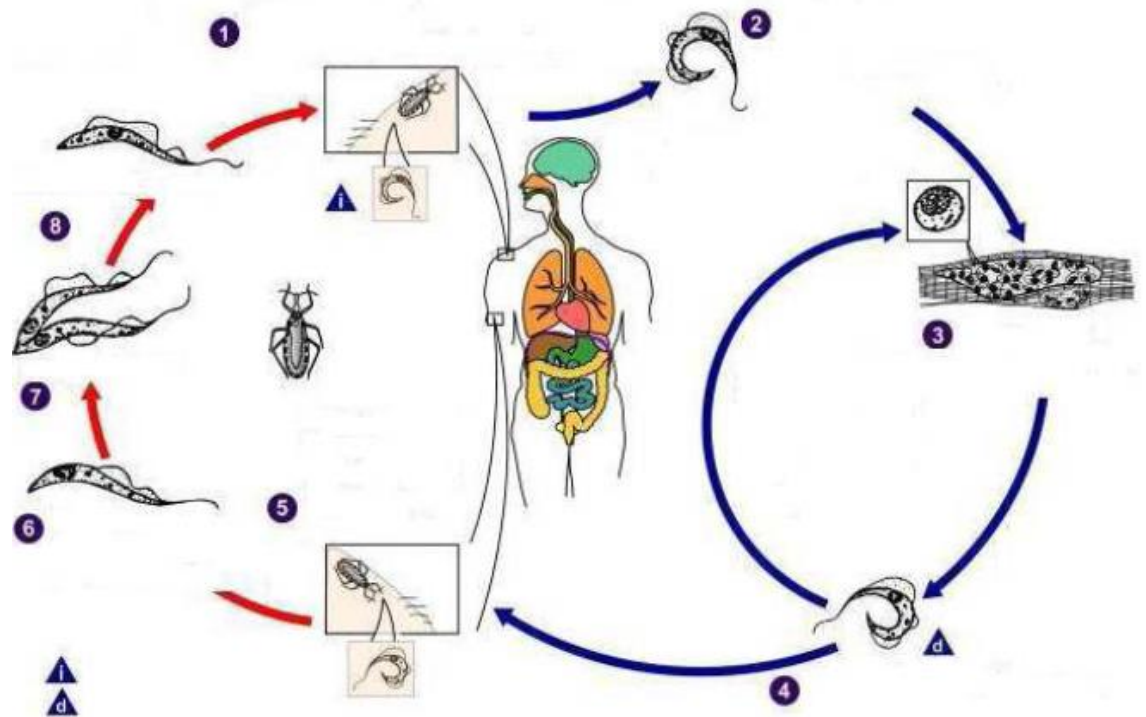
Em meados de 1970, países situados em áreas endêmicas como Brasil, Argentina, Chile, Bolívia e México desenvolveram políticas nacionais para controle da DC, com o objetivo de controlar os vetores e prevenção na área de biossegurança em procedimentos, como transfusões de sangue e transplantes (MONCAYO e SILVEIRA, 2009). Essas políticas foram realmente eficazes, sendo responsáveis pela diminuição da incidência de 700 mil casos/ano para 40 mil, diminuindo a mortalidade de mais de 45 mil para 12.500 no ano de 2006 (LESCURE, LE LOUP *et al.*, 2010).

## 1.2 CICLO DE VIDA DO *T. CRUZI*

O ciclo de vida do *T. cruzi* é muito complexo, com diversas formas de desenvolvimento, tanto nos vetores triatomíneos quanto nos hospedeiros mamíferos (RASSI, RASSI *et al.*, 2000). Durante a alimentação do vetor que é hematófago, ele pode sugar formas tripomastigotas circulantes do hospedeiro

infectado. No trato digestivo dos triatomíneos, essas formas tripomastigotas irão se diferenciar em epimastigotas, que é a forma multiplicativa do protozoário, na porção final do intestino as epimastigotas irão se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos, que é a forma infectante do protozoário (Figura 2). A transmissão dessas formas metacíclicas acontece durante a alimentação e são eliminados na urina e fezes dos triatomíneos. A porta de entrada para as formas infectantes se dá pelo contato das fezes e urina, com a mucosa ou por qualquer lesão preexistente ou da picada do inseto (RASSI, RASSI *et al.*, 2012).

**Figura 2-** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor e no hospedeiro humano



**Fonte:** BARBOSA (2009)

Nota: (1) O inseto pica e defeca ao mesmo tempo. O tripomastigota metacíclico passa à ferida nas fezes. (2) Os tripomastigotas invadem células onde se transformam em amastigotas. (3) Os amastigotas multiplicam-se dentro das células. (4) Os amastigotas transformam-se em tripomastigotas sanguíneos, as células são rompidas e os parasitas são liberados na corrente sanguínea podendo invadir novas células onde se multiplicam em amastigotas. (5) Os tripomastigotas sanguíneos podem ser sugados por um novo inseto, reiniciando o ciclo do parasita. (6) No tubo digestivo do inseto os tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas, que se multiplicam (7) e que se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (8). i = estágio infeccioso; d = estágio diagnóstico.

### 1.3 FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS

Após a infecção, o curso clínico é muito variável. Na fase aguda ou inicial, provavelmente o paciente desenvolverá um quadro de febre, adenomegalia, conjuntivite unilateral (sinal de Romana), miocardite, e meningoencefalite. A fase aguda da DC costuma ser fatal em cerca de 10% dos casos, sendo mais grave em crianças com menos de 3 anos de idade (COURA, 2007). Nesta fase ocorre presença de parasitos na circulação do hospedeiro. Após a fase inicial o indivíduo entra na fase crônica ou indeterminada, caracterizada por um período de latência crônica assintomática que pode permanecer por até 15 anos (COURA, 2007). Após este tempo, cerca de 27% dos indivíduos desenvolvem sintomas cardíacos, que podem levar até a morte súbita, 6% desenvolvem lesões digestivas e 3% podem desenvolver lesões no sistema nervoso periférico (CARLIER Y, 2010; NUNES, DONES *et al.*, 2013).

A fase aguda da infecção por DC representa a primeira interação entre o parasita e o hospedeiro, é nela que é iniciada a resposta imunológica. É provável que a interação entre os eventos imunológicos e o parasita durante a fase aguda irá alterar significativamente o curso da doença, tanto para uma resposta protetora ou patogênica na fase crônica (ANDRADE, GOLLOB *et al.*, 2014).

Já é descrito na literatura que durante a fase aguda, o hospedeiro apresenta uma forte ação do sistema imune, que leva ao controle da parasitemia. Os mecanismos exatos que atuam no controle dos parasitas não são totalmente esclarecidos. Acredita-se que eles dependem em grande maioria de células do sistema imune inato e adaptativo (BUSCAGLIA, CAMPO *et al.*, 2006)

### 1.4 SISTEMA IMUNOLÓGICO NA INFECÇÃO POR *T. CRUZI*

Na infecção experimental por *T. cruzi*, a resistência do hospedeiro é mediada tanto pela imunidade inata quanto pela adquirida, que necessita de efeitos combinados das células do sistema imunológico, como células exterminadoras naturais (NK), linfócitos citotóxicos (TCD8<sup>+</sup>) e auxiliares (TCD4<sup>+</sup>) (TOSELLO BOARI, AMEZCUA VESELY *et al.*, 2012). Há evidências de que células Th1 estimuladas por INF- $\gamma$  promovem proteção contra infecção por *T. cruzi* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SANOJA, CARBAJOSA *et al.*, 2013), ativando macrófagos para digerir o parasito

fagocitado e secretando citocinas inflamatórias (TOSELLO BOARI, AMEZCUA VESELY *et al.*, 2012). A resposta celular do padrão Th1 e os altos níveis de citocinas inflamatórias como INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  também estão relacionados com a patogênese da fase crônica da DC, uma vez que a produção descontrolada destas citocinas no miocárdio leva a destruição do tecido cardíaco devido seus efeitos citotóxicos. (GOMES, BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2005; FIUZA, FUJIWARA *et al.*, 2009).

A ativação da imunidade inata é seguida pela imunidade adaptativa, por meio da liberação de INF- $\gamma$  e IL-12, que atuam na diferenciação de linfócitos T específicos para *T. cruzi*. Essas células T específicas irão migrar em resposta a quimiocinas que são liberadas localmente e que também participam da resposta imunológica contra o parasita. De modo contrário, a produção de IL-10 e TGF- $\beta$  auxilia a replicação do parasito por inibição da atividade tripanocida dos macrófagos. Outros mecanismos celulares envolvidos na imunidade adaptativa incluem a indução de células Th1 Myd88 / IL-12-dependentes, resposta humoral mediada por células B específicas ao *T. cruzi*, células T CD8+, e mecanismos mediados por INF- $\gamma$  (BRYAN, GUYACH *et al.*, 2010; JUNQUEIRA, CAETANO *et al.*, 2010).

Estudos sugerem que a IL-10 presente no tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados por *T. cruzi* apresenta um papel anti-inflamatório e protetor nestes camundongos (SANOJA, CARBAJOSA *et al.*, 2013). E sua sinalização deficiente se correlaciona com uma maior mortalidade durante infecção experimental por *T. cruzi*, por uma resposta com predomínio de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (HUNTER, ELLIS-NEYES *et al.*, 1997; HOLSCHER, MOHRS *et al.*, 2000).

Citocinas do tipo TNF- $\alpha$  agem em conjunto com subtipos de IL-17 e IL-1 $\beta$  com função de melhorar a resposta inflamatória e a produção de beta-defensinas e outros peptídeos anti-microbianos (OUYANG, KOLLS *et al.*, 2008). Por outro lado, TGF- $\beta$  pode provocar síntese de colágeno e fibrose no tecido cardíaco contribuindo para desenvolvimento da insuficiência cardíaca em fases crônicas e também está relacionado com a lesão tecidual na fase aguda da infecção por *T. cruzi* (ROCHA RODRIGUES, DOS REIS *et al.*, 2012).

A capacidade de resistência frente à infecção por *T. cruzi* está ainda relacionada com a capacidade de linfócitos produzirem INF- $\gamma$  (ALMEIDA-LEITE, SILVA *et al.*, 2014) e TNF- $\alpha$  (Rocha Rodrigues, Dos Reis *et al.*, 2012), uma vez que estas citocinas estimulam macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO), que é a

molécula principal no controle da multiplicação intracelular de *T. cruzi* (ALMEIDA-LEITE, SILVA *et al.*, 2014), e também está relacionado a danos teciduais no hospedeiro (CHANDRA, TANOWITZ *et al.*, 2002), morte neuronal, diminuição da densidade de neurites (ALMEIDA-LEITE, GALVAO *et al.*, 2007) e contribui para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (ROCHA RODRIGUES, DOS REIS *et al.*, 2012). Neste contexto, altos níveis de NO já foram associados com a severidade da cardiomiopatia chagásica crônica (PEREZ-FUENTES, GUEGAN *et al.*, 2003).

### 1.5 FORMA CARDÍACA DA DOENÇA DE CHAGAS

A patogenia da miocardite ocorre pela interação da destruição celular causada pelo parasito no tecido cardíaco, com mecanismos imunes mediados pelo hospedeiro (CUNHA-NETO, DURANTI *et al.*, 1995). A hiperatividade imune é prejudicial para o hospedeiro devido a uma produção desequilibrada de citocinas contra o parasito (GOMES, BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003). Alguns estudos já mostraram que a presença do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco parece ser mais lesiva, que a destruição tecidual causada pelo parasito (VIANNA, 1911; CHAGAS, 1916; MAYER, SCHMIDT *et al.*, 1989).

A resposta imune na miocardite aguda é inicialmente mediada pela produção de INF- $\gamma$  por células T ativadas, que promovem a migração de células inflamatórias para locais de inflamação mediada por quimiocinas como CCL3 e CCL5 (BAFICA, SANTIAGO *et al.*, 2006).

A forma cardíaca se apresenta como uma miocardiopatia dilatada sendo que a inflamação crônica, muitas vezes de baixa intensidade, porém contínua, resultará em destruição tissular progressiva com fibrose extensa no coração. (KIERSZENBAUM, 2007; MARIN-NETO, CUNHA-NETO *et al.*, 2007; BONNEY E ENGMAN, 2008; DUTRA e GOLLOB, 2008; TANOWITZ, MACHADO *et al.*, 2009). Esta é a manifestação mais frequente e grave da DC (RASSI, RASSI *et al.*, 2000), podendo levar ao desenvolvimento de anormalidades no sistema de condução elétrica do coração, gerando bradiarritimias e taquiarritimias, aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, tromboembolismo e até morte súbita (RASSI, RASSI *et al.*, 2000; HIDRON, VOGENTHALER *et al.*, 2010; RASSI, RASSI *et al.*, 2010). A insuficiência cardíaca de etiologia chagásica tem uma maior mortalidade quando

comparada com insuficiências cardíacas de outras etiologias (FREITAS, CHIZZOLA *et al.*, 2005).

Também foi encontrado em estudos tanto experimentais de infecção por *T. cruzi* quanto em necropsias realizadas em indivíduos chagásicos, diminuição da população neuronal com um predomínio relevante do sistema parassimpático cardíaco (KOBBERLE, 1968). Tais acometimentos provocam disautonomia cardíaca que ocorre antes mesmo da fase crônica da doença, tanto nas formas cardíaca, digestiva e até mesmo na indeterminada (AMORIM, MANCO *et al.*, 1982; RIBEIRO, MORAES *et al.*, 2001; MARIN-NETO, CUNHA-NETO *et al.*, 2007).

Alguns estudos mostram que a produção excessiva de citocinas com padrão inflamatório é um mecanismo eficiente de proteção *in vivo* contra o parasito, diminuindo a parasitemia e parasitismo tecidual. Porém, esta resposta exacerbada oferece efeitos colaterais para o hospedeiro, como a destruição de cardiomiócitos funcionais, indução de apoptose e necrose do tecido através da liberação exacerbada de quimiocinas e conseqüentemente promoção de quimiotaxia de células inflamatórias para o tecido infectado (TEIXEIRA, HECHT *et al.*, 2011).

## 1.6 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

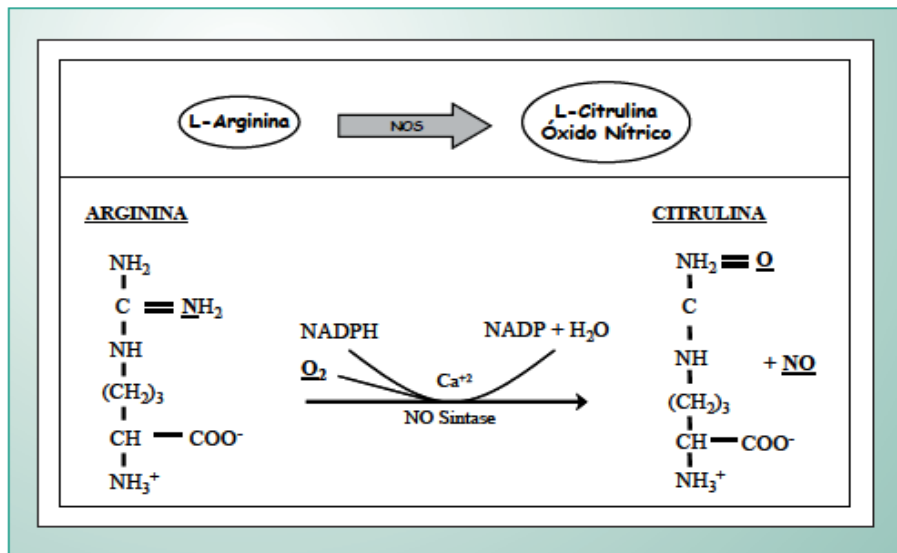
O óxido nítrico constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS e BILLIAR, 1994). O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

A síntese do NO ocorre pela oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é mediada pela enzima NO-sintase (NOS) (ELAHI, ASOPA *et al.*, 2007). (Figura 3) Uma variedade de isoformas de NOS foram descobertas em diferentes tecidos de mamíferos. Estudos bioquímicos e análise sequencial de aminoácidos mostram que estas isoformas representam uma família de proteínas, sendo produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas classes, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio ( $Ca^{++}$ ) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002). A c-NOS e a i-NOS

diferem-se entre si quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (MARLETTA, 1994).

A isoforma c-NOS é conhecida pela produção de pequenas quantidades de NO, da ordem de nano ou picomols, e sua ativação ocorre pela interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de  $Ca^{++}$ . A i-NOS não é expressa sob condições normais, ela é expressa quando estimulada por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, principalmente as consideradas inflamatórias incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas. Esta isoforma necessita de algumas horas para ser expressa, mas quando ela é sintetizada, ela é capaz de liberar grandes quantidades de NO, com capacidade de produção muito maior que a c-NOS, e a produção pela iNOS continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese estejam esgotados ou ocorra a morte celular. (CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002)

**Figura 3-** Formação do óxido nítrico a partir o metabolismo da L-Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase.



**Fonte:** (Zago e Zanescio, 2006)

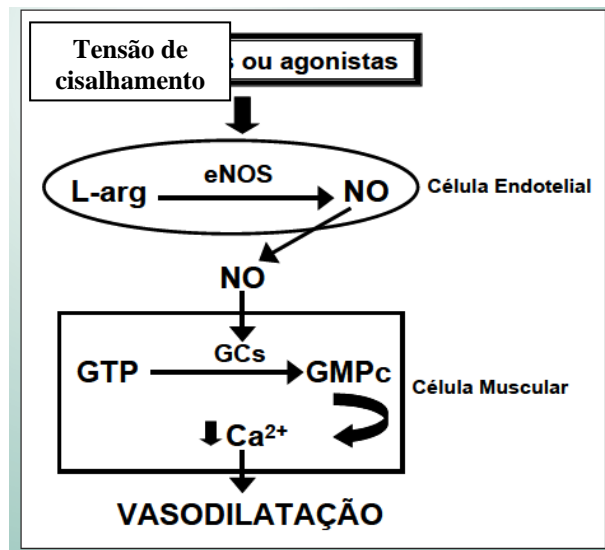
Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir o metabolismo da Arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase

Dentro da c-NOS existe duas isoformas diferentes, a eNOS/NOS3 que é expressa na membrana das células endoteliais e apresenta um grande papel no controle cardiovascular atuando diretamente na resistência vascular periférica com ação vasodilatadora, tendo assim um importante papel no controle da pressão

arterial(Figura 4)(ZAGO e ZANESCO, 2006) e a isoforma neuronal (nNOS, NOS-1 ou tipo I) identificada em neurônios (FORSTERMANN e KLEINERT, 1995), o NO produzido pela vida da nNOS, expressa preferencialmente no tecido nervoso atua como um neurotransmissor multifuncional no SNC, que leva informações tanto anterógrada quanto retrogradamente e está relacionada à modulação da liberação de neurotransmissores e à plasticidade sináptica(FEIL e KLEPPISCH, 2008).

A expressão de iNOS é comum em células inflamatórias nos locais onde haja a presença de inflamação ativa. A combinação de alta concentração de óxido nítrico, associado à outros radicais de oxigênio, podem mediar diretamente a citotoxicidade celular, sendo assim, o NO, um componente crítico da resposta imune(MOILANEN e VAPAATALO, 1995). Mostrando assim que o NO tem diferentes funções dependendo da via e local pelo qual ele é produzido.

**Figura 4** – Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção.



**Fonte:** (Zago e ZanESCO, 2006)

Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção.

O NO no miocárdio possui várias funções, dentre elas seria o papel inotrópico negativo, regulação da pressão arterial, tônus coronários, contratilidade do miocárdio e agregação de plaquetas (SUMERAY, REES *et al.*, 2000).

A resistência frente ao *T. cruzi* é principalmente relacionada com a capacidade de produção de INF- $\gamma$ , esta citocina atua controlando a proliferação do parasita nos tecidos e no sangue de uma maneira dependente da NOS2. Entretanto

o NO parece não ser necessário para a resistência do hospedeiro frente a cepas de *T. cruzi* menos virulentas (CUMMINGS e TARLETON, 2004). Além disso resultados sugerem que animais deficientes de iNOS apresentam mortalidade tardia quando comparados com animais deficientes para INF- $\gamma$  após infecção pelo *T. cruzi* (MICHAJLOWSKY, SILVA *et al.*, 2001; CUMMINGS e TARLETON, 2004).

A fase aguda da infecção por *T. cruzi* promove uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias que leva a indução da expressão da iNOS. O NO produzido por esta via apresenta efeito tripanocida extremamente eficiente, sendo fundamental para o controle parasitário do hospedeiro (PANIS, MAZZUCO *et al.*, 2011), porém a hiperprodução de NO pela via da iNOS gera graves consequências sistêmicas, sendo a causa da hipotensão durante choque séptico (ASSREUY, 2006). O trabalho de Santiago, Gonzalez Lombana *et al.* (2012) encontrou uma produção excessiva de NO durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* em animais *phox* KO, associado com uma queda precoce e permanente na pressão arterial média destes animais, evento similar foi encontrado na infecção em animais selvagens, porém a pressão arterial voltou aos valores iniciais após 3 dias. Neste mesmo estudo os animais *phox* KO tratados com 1400w, inibidor seletivo de iNOS, apresentaram recuperação da hipotensão gerada pela maior produção de NO na infecção experimental por *T. cruzi*. Outro mecanismo capaz de suprimir a produção de NO pela via da iNOS seria o aumento do NO produzido pela via da eNOS (ARAUJO, FERREZIN *et al.*, 2012). O mecanismo envolvido na supressão da produção de NO pela via da iNOS pelo óxido nítrico da via da eNOS ainda não foi totalmente elucidado, mas parece envolver a transcrição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o NO pode suprimir a ativação do NF- $\kappa$ B pela indução e estabilização do seu fator inibitório i- $\kappa$ B (PENG, LIBBY *et al.*, 1995). Além disso o NO já foi encontrado interferindo diretamente na ligação do NF- $\kappa$ B com a região promotora que codifica a iNOS tanto *in vitro* (PARK, LIN *et al.*, 1997) quanto *in vivo* (DELATORRE, SCHROEDER *et al.*, 1999).

Na infecção por *T. cruzi* ocorre um aumento da expressão de células iNOS positivas no tecido cardíaco e aumento sistêmico dos níveis de NO, esses achados estão diretamente relacionados com lesões cardíacas, incluindo anormalidades de sistema de condução elétrico do coração (CARVALHO, SILVERIO *et al.*, 2012).

A atividade física também é uma condição conhecida por produzir NO pela via constitutiva ativando a eNOS, pelo aumento da força de cisalhamento do sangue sobre a parede do endotélio. Na musculatura vascular o NO irá ativar a enzima guanilato ciclase solúvel que formará o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) a partir da quebra do trifosfato de guanosina (AMP). Essa reação irá ativar a bomba de cálcio no retículo sarcoplasmático da célula muscular vascular, diminuindo a quantidade de cálcio citoplasmático promovendo então relaxamento vascular, e contribuindo para diminuir a pressão arterial (ZAGO e ZANESCO, 2006).

### 1.7 RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE FÍSICA, SISTEMA IMUNOLÓGICO E DOENÇA DE CHAGAS

Alto nível de capacidade aeróbica promovida pelo exercício físico, observado como consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ), está correlacionado com baixa mortalidade tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com doenças cardiovasculares (MYERS, PRAKASH *et al.*, 2002).

Exercícios físicos de baixa intensidade podem provocar diminuição da inflamação de baixo grau, presente em doenças cardiovasculares elevando as respostas de citocinas anti-inflamatórias (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; WALSH, GLEESON *et al.*, 2011). A resposta clássica de citocinas relacionadas com exercício de intensidade moderada resulta em aumento da circulação do receptor antagonista de IL-1, aumento da concentração de IL-10 e IL-6 no músculo esquelético, enquanto as citocinas pró inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são geralmente reduzidas (WALSH, GLEESON *et al.*, 2011).

Já é descrito que as respostas das células Th1 são suprimidas após exercícios de alta intensidade, o que explica a maior susceptibilidade à infecção após exercícios prolongados de alta intensidade (LANCASTER, HALSON *et al.*, 2004; KOHUT, MARTIN *et al.*, 2005; WALSH, GLEESON *et al.*, 2011). Ao contrário, em resposta a sequência de exercícios de intensidade moderada ocorre aumento das respostas das células Th1 que podem melhorar as respostas imunológicas a agentes infecciosos (KOHUT, BOEHM *et al.*, 2001; KOHUT, THOMPSON *et al.*, 2004; NAKAMURA, KOBAYASHI *et al.*, 2010).

Recentemente, estudos mostraram que atividade física pode atuar como um fator de resistência contra infecção por *T. cruzi* em animais (SOARES, OCCHI *et al.*, 2010; OCCHI, SOARES *et al.*, 2012). Um estudo utilizando

camundongos Swiss submetidos a um programa de atividade física crônica e moderada, seguido por infecção por *T. cruzi*, mostrou que o treinamento físico foi eficaz tanto na diminuição da parasitemia como na redução do infiltrado inflamatório da lâmina própria do intestino na fase crônica da infecção. Além disso, esse estudo mostrou que os camundongos treinados apresentaram melhor modulação imune quando comparado com os camundongos do grupo sedentário (MOREIRA, SANTOS *et al.*, 2013).

Até o presente momento não há estudos comparando efeitos da atividade física, no padrão de produção de citocinas inflamatórias e produção NO e sua relação com os parâmetros cardiovasculares durante o curso da infecção aguda por *T. cruzi*. Dessa forma, esse foi o propósito do presente estudo, que se encontra no anexo desta apresentação; tendo sido submetido ao periódico: Journal of Applied Physiology.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Com base nos dados expostos anteriormente, investigamos o efeito do treinamento físico prévio, na fase aguda da infecção chagásica experimental, avaliando a parasitemia, sobrevivência, parâmetros cardiovasculares, produção de NO e citocinas, carga parasitária e infiltrado inflamatório no tecido cardíaco. Para isso utilizamos camundongos Swiss, treinados e sedentários infectados por *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a eficácia do programa de treinamento físico na performance dos camundongos, no teste de esforço e medição dos parâmetros cardiovasculares ao final do programa de treinamento físico.

2.2.2 Avaliar o papel do treinamento físico no curso da infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*, determinando a parasitemia e sobrevivência de animais treinados e sedentários.

2.2.3 Avaliar as alterações nos parâmetros cardiovasculares na fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*, (dias 7, 14 e 20 pós infecção), de animais treinados e sedentários.

2.2.4 Investigar o efeito do treinamento físico prévio sobre a carga parasitária e infiltrado inflamatório no tecido cardíaco por meio da análise histopatológica, determinando o número de ninhos de amastigotas e contagem total de núcleos celulares;

2.2.5. Avaliar a produção de NO plasmático e cardíaco, nos dias 7, 14 e 20 pós infecção por *Trypanosoma cruzi*, de camundongos treinados e sedentários, utilizando a técnica de cádmio-Griess.

2.2.6 Avaliar o papel da atividade física na modulação da produção plasmática de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6, IL-12, IFN, e IL-10), MCP-1 por citometria de fluxo, de animais treinados e sedentários, durante a fase aguda da infecção por *Trypanosoma cruzi*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos bem como a manutenção do *T. cruzi* foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa de Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina com o protocolo: 28105.2014.72.

Os experimentos foram realizados como estudo randomizado, cego e controlado. Foram utilizados camundongos Swiss machos de 30 dias de idade, que foram distribuídos em dois grupos: treinado e sedentário.

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (414x344x168 milímetros) com um fecho de grade galvanizado e uma depressão central, onde foi fornecido água potável clorada e autoclavada e alimentos à vontade. As caixas foram forradas com cepilho autoclavado e lavadas 3 vezes por semana. As caixas permaneceram na sala de condicionamento (temperatura, 21-23 ° C) sob um ciclo claro/escuro 12/12 h de luz. Os animais tiveram acesso a água potável clorada e autoclavada e alimentos à vontade.

#### 3.2 MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Foi realizada uma sessão previamente ao início do protocolo de atividade física, e duas sessões durante o protocolo de atividade física, uma no final da quinta semana e a outra ao final da nona semana da atividade física para confirmação da eficácia da atividade física através da bradicardia de repouso. Também foi realizada a mensuração dos parâmetros cardiovasculares após a infecção nos dias 7, 14, 20. Para isso foi utilizado o método de registro de volume de pressão, onde os parâmetros cardiovasculares como frequência cardíaca, pressão arterial média, pressão arterial diastólica e pressão arterial sistólica é obtida através do sistema não invasivo CODA (Kent Scientific, Torrington, CT) pelo volume de pressão obtido da cauda do camundongo, para a realização dessas análises é necessário que o animal esteja contido dentro de um contensor desenvolvido pela própria fabricante onde o animal se encontra impedido de realizar qualquer movimento.

### 3.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Animais com 30 dias de idade foram submetidos a um programa de atividade física aeróbica em esteira motorizada, por um período de 9 semanas. O exercício foi realizado em uma sessão diária, com frequência de 5 vezes por semana, sendo que na primeira semana, cada sessão diária teve duração de 10 minutos, com velocidade de 8m/min, com o objetivo de adaptação do animal à esteira (BRUM, DA SILVA *et al.*, 2000).

Após o período de adaptação, os animais realizaram um teste de esforço em esteira sem elevação. Inicialmente a esteira motorizada foi graduada com a velocidade foi de 0,8m/min durante os 3 primeiros minutos, e após cada 3 minutos, foi acrescentado da velocidade inicial 5m/min de forma consecutiva, até a exaustão dos animais, com o objetivo de obter o valor da velocidade máxima alcançada no teste de esforço. Essa velocidade máxima, foi utilizada como parâmetro de adequação da velocidade durante o treinamento, onde foram utilizados 30% da velocidade máxima para aquecimento nos 5 primeiros minutos do protocolo e 5 minutos para desaquecimento nos últimos 5 minutos da sessão, e 60% da velocidade máxima com objetivo de condicionamento físico do animal (BRUM, Da SILVA *et al.*, 2000).

Na segunda semana, já com os dados do teste de esforço, estes animais foram submetidos a um protocolo de 30 minutos diários de condicionamento físico, com acréscimo de 3 minutos em cada sessão subsequente, até atingir o tempo máximo de 50 minutos. Após o final da quinta semana do protocolo de atividade física, estes animais foram submetidos a um novo teste de esforço para adequação da velocidade, sendo que na primeira sessão da sexta semana os animais já partiam com 50 minutos de condicionamento com a velocidade adaptada. Ao final do protocolo na nona semana, estes animais realizaram novamente o teste de esforço para avaliar o desempenho e a eficácia do protocolo de atividade física (BRUM, Da SILVA *et al.*, 2000).

A esteira foi adaptada para pequenos animais e possui um sistema que permitiu o planejamento do treinamento durante a sessão e controle de velocidade digital com 2m/min de sensibilidade. O treinamento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Mecanismos de choque ou similares não foram utilizados para induzir os animais a realizar o exercício.

### 3.4 INFECÇÃO

Após o término do protocolo de atividade física, os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Treinado controle (TC; submetidos ao programa de atividade física porém não infectados), grupo treinado e infectado (TI; submetido ao programa de atividade física e também a infecção por *T. cruzi*, grupo sedentário controle (SC; não submetido ao programa de treinamento físico e também não infectado) e o grupo sedentário infectado (SI; os animais deste grupo não foram submetidos ao programa de atividade física, porém foram infectados).

Para os grupos infectados utilizou-se um inóculo intraperitoneal de  $5 \times 10^3$  formas de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Já nos grupos não infectados utilizou um inóculo controle de PBS com o mesmo volume administrado nos grupos infectados. Os grupos TI e TC foram inoculados no terceiro dia após o término do programa de atividade física.

### 3.5 PARASITEMIA E SOBREVIDA

Parasitemia foi avaliada em 5  $\mu$ L de sangue venoso heparinizado obtido da cauda do camundongo. Contou-se o número de parasitas em 50 campos microscópicos. Este procedimento foi realizado em dias alternados após o terceiro dia de infecção por *T. cruzi*. Os dados obtidos foram expressos como número de parasitos por mL (BRENER, 1962). E as taxas de sobrevivência dos camundongos infectados foram avaliadas por um período de 60 dias.

### 3.6 OBTENÇÃO DO PLASMA

No 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia após infecção, os camundongos foram anestesiados (100 mg / kg de Ketamina e 10 mg / kg Xilasina) e realizada punção cardíaca, com seringas de 1mL heparinizadas, e os animais submetidos à eutanásia. O sangue obtido foi centrifugado e coletado o plasma. O plasma foi aliquoteado e

mantido a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização da quantificação de NO ou de citocinas.

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE NO

Concentração de NO do tecido cardíaco e plasma de camundongos controles e infectados foi realizada nos dias 7, 14 e 20 após a inoculação do PBS ou do *T. cruzi*. A concentração de NO foi estimada pelo método de medição de nitrito como já descrito por NAVARRO-GONZALVEZ, GARCIA-BENAYAS *et al.* (1998) com algumas modificações. Para dosar o NO no tecido cardíaco, os corações foram triturados em solução salina tamponada com fosfato até uma concentração final de 100 mg/ peso de tecido úmido por / mililitro de PBS. Em seguida, centrifugou-se a 10.000rpm durante 2 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Após esse procedimento, a quantificação de NO segue os mesmos passos, tanto para plasma ou para tecido cardíaco.

Adicionou-se  $70\mu\text{L}$  de uma solução de NaOH a 55mM (Merck) a cada amostra. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 10.000rpm por 5 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes finais e recuperados foram diluídos em solução tampão de glicina (45 g/L pH 9,7, Merck), numa proporção de 5:1.

Grânulos de cádmio armazenados em 100mM de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck) foram lavado três vezes em água destilada estéril e foi adicionado uma solução de 5 mM  $\text{CuSO}_4$  em tampão glicina-NaOH (15 g/L, pH 9.7, Merck) durante 5 minutos e os grânulos de cádmio revestidos de cobre foram usados dentro de 10 minutos. O tratamento de cádmio foi utilizado para converter todo o nitrato em nitrito nas amostras biológicas, proporcionando assim uma estimativa mais precisa do número total de NO nas amostras originais. Nos grânulos ativados (600–1000 mg, aproximadamente 1–2 grânulos) foi adicionada glicina tamponada, diluída no sobrenadante e suavemente agitada por 10 minutos. Alíquotas de  $200\mu\text{L}$  foram transferidas para tubos de microcentrifugas para determinação do nitrito. Para cada tubo foi adicionado o mesmo volume de reagente de Griess (reagente I: 50mg de N-naftil etilenodiamina em 250 ml de água destilada; reagente II: 5g de ácido sulfanílico, em 500 mL de HCl 3M, Sigma). Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 2 min a  $25^{\circ}\text{C}$ . Finalmente,  $100\mu\text{L}$  de cada tubo foram adicionados a poços em triplicado sobre uma microplaca de 96 poços.

Para realizar curva de calibração de nitrito foi preparada uma diluição de  $\text{NaNO}_2$  (Merck) em água destilada estéril para criar concentrações variando de 250 até  $0\mu\text{M}$ . Após isso,  $100\mu\text{L}$  de reagente de Griess foram adicionados em triplicado aos poços das três primeiras colunas de cada placa de microtitulação. A absorbância foi lida a 550 nm utilizando um leitor de microplacas padrão (Multiskan EX, LabSystems, Minnesota USA). Os resultados finais foram expressos em  $\mu\text{M}$  de nitrito.

### 3.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a coleta de sangue os animais foram submetidos à eutanásia através de deslocamento cervical, e os corações foram imediatamente removidos e cortados transversalmente em três partes. Uma delas foi armazenada a  $-80^\circ\text{C}$  para dosagem do NO. O tecido restante foi fixado em formalina tamponada 10%. Amostras de tecido com foram embebida em parafina, após foi corado com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio de luz. O parasitismo cardíaco foi avaliado pela contagem do número de ninhos de amastigotas que foram visualizados em seis seções inteiras de coração por animal, em ampliação de 400x para cada seção de tecido. Os resultados do parasitismo cardíaco foram expressos como a média do número de ninhos de amastigotas por secção total do tecido cardíaco (ROGGERO, PEREZ *et al.*, 2006).

O infiltrado inflamatório foi avaliado pelo número total de células nucleadas em cinquenta campos microscópicos com um aumento final de 100x, em quatro cortes não consecutivos corados com HE (espessura de  $7\mu\text{m}$ )(Da Matta Guedes, Gutierrez *et al.*, 2010). As seções foram examinadas utilizando um microscópio a uma ampliação final de 100x; as imagens foram analisadas usando o software ImageJ v1.49 (National Institute of Health, USA).

### 3.9 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Amostras de plasma, macerado de coração e baço foram submetidas ao método de dosagem de citocinas por citometria de fluxo, (*Cytometric Bead Array* (CBA)). Foi utilizado o kit de quantificação de citocinas “Mouse Inflammation Kit”, o qual quantifica TNF, IL-6, IL-12, IFN, MCP-1 e IL-10 murino (BD

Bioscience). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Seguido de análise pelo software FCAP Array (Softflow, Inc). O limite de detecção para este teste é de 20-5.000pg/mL.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a significância foi avaliada por análise de variância de duas vias (ANOVA two-way), seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey e/ou Sidak; foram consideradas diferenças significativas resultados com  $p < 0,05$ . A taxa de sobrevivência foi determinada através do teste de Breslow-Gehan-Wilcoxon. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, SanDiego, CA).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-LEITE, C. M. et al. **Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages.** Neurobiol Dis. 25: 170-8 p. 2007.
- ALMEIDA-LEITE, C. M. et al. Sympathetic glial cells and macrophages develop different responses to Trypanosoma cruzi infection or lipopolysaccharide stimulation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 459-65, Jul 2014. ISSN 1678-8060
- AMORIM, D. S. et al. Chagas' heart disease as an experimental model for studies of cardiac autonomic function in man. **Mayo Clin Proc**, v. 57 Suppl, p. 48-60, Jul 1982. ISSN 0025-6196
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014. ISSN 1935-2735
- ARAUJO, A. V. et al. Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. **Nitric Oxide**, v. 27, n. 1, p. 59-66, Jun 30 2012. ISSN 1089-8611
- ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 165-73, Jun 2006. ISSN 1871-5303 (
- BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3515-9, Sep 15 2006. ISSN 0022-1767
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996. ISSN 0002-9513
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Curr Mol Med**, v. 8, n. 6, p. 510-8, Sep 2008. ISSN 1566-5240
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 389-96, Nov-Dec 1962. ISSN 0036-4665
- BRUM, P. C. et al. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-22, Dec 2000. ISSN 1524-4563
- BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e733, 2010. ISSN 1935-2735
- BUSCAGLIA, C. A. et al. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 3, p. 229-36, Mar 2006. ISSN 1740-1526

CARRIER Y, T. C. **Maternal-Fetal transmission of Trypanosoma cruzi**. 1. Amsterdam: 2010.

CARVALHO, C. M. et al. Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of Trypanosoma cruzi-infected rhesus monkeys: association with heart injury. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1644, 2012. ISSN 1935-2735

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002. ISSN 0102-8650.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologi´a e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiolo´gico de nova entidade morbida do homen. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159–218, 1909.

\_\_\_\_\_. Processos patojenicos da tripanozomiase americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 8, p. 5-35, 1916.

CHANDRA, M. et al. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi (Tulahuen strain). **Int J Parasitol**, v. 32, n. 7, p. 897-905, Jun 15 2002. ISSN 0020-7519

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 113-22, Oct 30 2007. ISSN 0074-0276

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009. ISSN 1678-8060

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Infect Immun**, v. 72, n. 7, p. 4081-9, Jul 2004. ISSN 0019-9567

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 8, p. 3541-5, Apr 11 1995. ISSN 0027-8424

DA MATTA GUEDES, P. M. et al. IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e604, 2010. ISSN 1935-2727.

DELATORRE, A. et al. Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. **J Immunol**, v. 162, n. 7, p. 4101-8, Apr 1 1999. ISSN 0022-1767.

DIAS, J. C. Chagas disease: successes and challenges. **Cad Saude Publica**, v. 22, n. 10, p. 2020-1, Oct 2006. ISSN 0102-311X

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 287-92, Jun 2008. ISSN 0951-7375

ELAHI, M.; ASOPA, S.; MATATA, B. NO-cGMP and TNF-alpha counter regulatory system in blood: understanding the mechanisms leading to myocardial dysfunction and failure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n. 1, p. 5-14, Jan 2007. ISSN 0006-3002

FEIL, R.; KLEPPISCH, T. NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. **Handb Exp Pharmacol**, n. 184, p. 529-60, 2008. ISSN 0171-2004

FIUZA, J. A. et al. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 9, p. e512, 2009. ISSN 1935-2735

FORSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 352, n. 4, p. 351-64, Oct 1995. ISSN 0028-1298

FREITAS, H. F. et al. Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, v. 102, n. 2, p. 239-47, Jul 10 2005. ISSN 0167-5273

GOMES, J. A. et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7960-6, Dec 2005. ISSN 0019-9567

GOMES, J. A. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1185-93, Mar 2003. ISSN 0019-9567

GORLA D, N. F. **Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research.** 1. Burlington (VA): 2010.

HIDRON, A. et al. Cardiac involvement with parasitic infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 2, p. 324-49, Apr 2010. ISSN 1098-6618

HOLSCHER, C. et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice. **Infect Immun**, v. 68, n. 7, p. 4075-83, Jul 2000. ISSN 0019-9567

HUNTER, C. A. et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 158, n. 7, p. 3311-6, Apr 1 1997. ISSN 0022-1767

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, 2010. ISSN 1462-3994

KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. **Acta Parasitol**, p. 1-12, 2007.

KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Adv Parasitol**, v. 6, p. 63-116, 1968. ISSN 0065-308X

KOHUT, M. L.; BOEHM, G. W.; MOYNIHAN, J. A. Moderate exercise is associated with enhanced antigen-specific cytokine, but not IgM antibody production in aged mice. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 11, p. 1135-50, Aug 2001. ISSN 0047-6374

KOHUT, M. L. et al. Glucocorticoids produced during exercise may be necessary for optimal virus-induced IL-2 and cell proliferation whereas both catecholamines and glucocorticoids may be required for adequate immune defense to viral infection. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 5, p. 423-35, Sep 2005. ISSN 0889-1591

KOHUT, M. L. et al. Exercise training-induced adaptations of immune response are mediated by beta-adrenergic receptors in aged but not young mice. **J Appl Physiol (1985)**, v. 96, n. 4, p. 1312-22, Apr 2004. ISSN 8750-7587

LANCASTER, G. I. et al. Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. **Exerc Immunol Rev**, v. 10, p. 91-106, 2004. ISSN 1077-5552

LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 8, p. 556-70, Aug 2010. ISSN 1474-4457

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 6 2007. ISSN 1524-4539

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927-30, Sep 23 1994. ISSN 0092-8674

MAYER, B. et al. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca<sup>2+</sup>-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 164, n. 2, p. 678-85, Oct 31 1989. ISSN 0006-291X

MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 159, n. 5, p. 1723-33, Nov 2001. ISSN 0002-9440

MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann Med**, v. 27, n. 3, p. 359-67, Jun 1995. ISSN 0785-3890

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 17-30, Jul 2009. ISSN 1678-8060

MOREIRA, N. M. et al. Moderate physical exercise reduces parasitaemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int J Exp Pathol**, v. 94, n. 6, p. 426-35, Dec 2013. ISSN 1365-2613

MORRIS, S. M., JR.; BILLIAR, T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am J Physiol**, v. 266, n. 6 Pt 1, p. E829-39, Jun 1994. ISSN 0002-9513

MUNOZ-SARAVIA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Fail Rev**, v. 17, n. 1, p. 45-64, Jan 2012. ISSN 1573-7322

MYERS, J. et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. **N Engl J Med**, v. 346, n. 11, p. 793-801, Mar 14 2002. ISSN 1533-4406

NAKAMURA, S. et al. Effect of exercise on gene expression profile in unfractionated peripheral blood leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, n. 1, p. 846-51, Jan 1 2010. ISSN 1090-2104

NAVARRO-GONZALVEZ, J. A.; GARCIA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin Chem**, v. 44, n. 3, p. 679-81, Mar 1998. ISSN 0009-9147

NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 9, p. 767-76, Aug 27 2013. ISSN 1558-3597

OCCHI, R. C. et al. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. **Ver. Bras. Méd. Esp.**, n. 19, p. 51-57, 2012.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454-67, Apr 2008. ISSN 1097-4180

PANIS, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 58-65, Jan 2011. ISSN 1090-2449

PARK, S. K.; LIN, H. L.; MURPHY, S. Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-kappaB binding to DNA. **Biochem J**, v. 322 ( Pt 2), p. 609-13, Mar 1 1997. ISSN 0264-6021

PENG, H. B.; LIBBY, P.; LIAO, J. K. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. **J Biol Chem**, v. 270, n. 23, p. 14214-9, Jun 9 1995. ISSN 0021-9258

PEREZ-FUENTES, R. et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 293-9, Mar 2003. ISSN 0020-7519

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005. ISSN 8750-7587

PIRON, M. et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). **Transfusion**, v. 48, n. 9, p. 1862-8, Sep 2008. ISSN 1537-2995

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, v. 23, n. 12, p. 883-9, Dec 2000. ISSN 0160-9289

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012. ISSN 1557-9824

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010. ISSN 1474-547X

RIBEIRO, A. L. et al. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. **Am Heart J**, v. 141, n. 2, p. 260-5, Feb 2001. ISSN 0002-8703

ROCHA RODRIGUES, D. B. et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 361730, 2012. ISSN 1740-2530

ROGGERO, E. et al. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J Endocrinol**, v. 190, n. 2, p. 495-503, Aug 2006. ISSN 0022-0795

SANOJA, C. et al. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65820, 2013. ISSN 1932-6203

SANTIAGO, H. C. et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1492, 2012. ISSN 1935-2735

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, Oct 30 2007. ISSN 0074-0276

SOARES, C. S. et al. Produção de fator de necrose tumoral-alfa e peróxido de hidrogênio na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos ao exercício. **Acta Scientiarum Health Sci.**, n. 32, p. 57-60, 2010.

SUMERAY, M. S.; REES, D. D.; YELLON, D. M. Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. **J Mol Cell Cardiol**, v. 32, n. 1, p. 35-42, Jan 2000. ISSN 0022-2828

TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Prog Cardiovasc Dis**, v. 51, n. 6, p. 524-39, May-Jun 2009. ISSN 1873-1740

TEIXEIRA, A. R. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 3, p. 592-630, Jul 2011. ISSN 1098-6618

TOSELLO BOARI, J. et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002658, 2012. ISSN 1553-7374

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”: esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 3, p. 276-292, 1911.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011. ISSN 1077-5552

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, 2015. Acesso em: 20/11/2015.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arq Bras Cardiol**, v. 87, n. 6, p. e264-70, Dec 2006. ISSN 1678-4170

**4 ARTIGO SUBMETIDO AO PLOS ONE****Treadmill Exercise Training Modulates Nitric Oxide and Cytokine  
Production Improving Cardiovascular Response and Resistance to  
*Trypanosoma cruzi* Infection**

**Bruno Fernando Cruz Lucchetti<sup>1,2</sup>, Nágela Ghabdan Zanluqui<sup>2</sup>, Hiviny de Ataides Raquel<sup>1</sup>, Maria Isabel Lovo-Martins<sup>2</sup>, Vera Lúcia Hideko Tatakihara<sup>2</sup>, Mônica de Oliveira Belém<sup>3</sup>, Lisete Compagno Michelini<sup>4</sup>, Eduardo José de Almeida Araújo<sup>3</sup>, Phileo Pinge-Filho<sup>2</sup>, Marli Cardoso Martins-Pinge<sup>1\*</sup>**

1 Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina - PR, Brazil.

2 Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina - PR, Brazil.

3 Department of Histology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina - PR, Brazil.

4 Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

Short title: Treadmill exercise and resistance to *T. cruzi* infection

\*Corresponding author: Marli C. Martins-Pinge, Ph.D.: Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina; Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86055-900, Londrina, PR, Brasil. Tel.: +55 43 3371 5927; fax: +55 43 3371 4467. E-mail: martinspinge@uel.br (M.C. Martins-Pinge)

## Abstract

There is evidence suggesting that exercise training (ET) acts as a factor towards resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. However, the interaction between mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and nitric oxide (NO) during the acute phase of infection has not been elucidated yet. Swiss mice were randomly assigned into four groups (n = 10/group): sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary infected (SI), and trained infected (TI). ET was performed on the treadmill for nine weeks. These mice were then infected with  $5 \times 10^3$  trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). We observed resting bradycardia and improved performance in trained animals compared with in sedentary ones. On the 20th day post-infection (DPI), we found a decrease in HR in SI animals compared to TI animals ( $699.73 \pm 42.37$  vs.  $742.11 \pm 25.35$  bpm, respectively,  $P < 0.05$ ). We also observed increased production of NO in cardiac tissue on the 20th DPI in the SI group, normalized in TI group ( $20.73 \pm 2.74$  vs.  $6.51 \pm 1.19$   $\mu$ M, respectively). Plasma pro-inflammatory cytokines (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,) and MCP-1 were increased in SI animals, but decreased in TI animals. The increase in parasitemia on the 15<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> DPI in the SI group was attenuated in the TI group. TI animals also showed increased survival compared to SI animals. Our results suggest that previous ET plays a preventive role in resistance to *T. cruzi* infection, modulating cardiovascular aspects, inflammatory reaction, and NO levels of infected mice, thus promoting prevention benefits for Chagas disease.

**Keywords:** Chagas disease; exercise training; nitric oxide; arterial pressure; heart rate

## Introduction

Chagas disease (CD) is a complex parasitic disease caused by infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* [1]. CD is endemic to Latin America but is increasingly found in other parts of the world, including countries previously considered free of CD such as Japan [2], Australia, and New Zealand [3, 4]. There is an estimate of 6-7 million people currently infected with *T. cruzi*, and the cost of treatment for CD remains substantial. In Colombia alone, the annual cost of medical care for all patients with CD was estimated to be about US \$267 million in 2008. Spraying insecticide to control vectors would cost nearly US \$5 million annually [5].

Clinically, *T. cruzi* infection causes acute myocarditis, followed by chronic cardiomyopathy and vasculopathy, in humans and experimental models [6]. Most infected individuals remain asymptomatic for several years. However, approximately 30% of these individuals progress to the cardiac or digestive forms of the disease, manifesting symptoms such as arrhythmias, heart insufficiency, megacolon, and megaesophagus [7].

Since the discovery of *T. cruzi* more than 100 years ago as the etiological agent of CD, a cure has been pursued. It took 50 years to discover nifurtimox, a specific drug to treat this neglected disease. However, apart from the discovery and development of benznidazole some years later, no improvements in chemotherapy have been made regarding safety or effectiveness, despite a half century of intense research [8]. Patients who undergo etiologic treatment may present symptoms of constipation and severe intestinal complications [9], constituting a substantial challenge in the implementation of alternative strategies to improve the quality of life of these patients.

Moderate physical exercise (MPE) has been shown to contribute significantly to the preservation of nitrergic [10] and colonic myenteric [11, 12] neurons during *T. cruzi* infection. Pre-infection aerobic training induced some improvement towards the immune response to *T.*

*cruzi* infection in mice [13]. MPE also contributes a factor of resistance against the development of infections in animals [10-12] by stimulating an immune response [13, 14]. Mice infected with *T. cruzi* develop a cardio/anemic/renal syndrome in the acute phase, and on the 15th day post infection (DPI), the arterial pressure increases above basal levels in BALB/c mice [15]. Furthermore, physical exercise is recognized as a hypotensive agent in both humans and animals, especially when training is carried out at low to moderate intensity. In this case, it acts as a powerful stimulus for cardiovascular structural remodeling [16-18].

The pro-inflammatory cytokines IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  act in concert to activate macrophages to kill parasites such as *T. cruzi* through the production of nitric oxide (NO) and nitrogen free radicals [19]. It is now appreciated that pro-inflammatory cytokine production is a “double-edged sword”: while enhancing intracellular parasite killing it may also contribute to damage of the host tissue, including the heart, resulting in acute myocarditis and chronic cardiomyopathy [20, 21]. NO is an important cytotoxic and cytostatic factor in cell-mediated immunity to intracellular pathogens [22]. Nevertheless, excessive NO production may cause host injury, including a reduction in myocardial contractibility [23]. However, the physiological network of disturbances imposed by parasitic infections has not been addressed thoroughly. The main objective of the present study is to characterize improvements due to exercise training (ET) prior to the acute phase of *T. cruzi* infection. We showed that ET prior to *T. cruzi* infection plays a preventive role in the resistance against *T. cruzi* infection by modulating NO and cytokines production differently from sedentary-infected mice.

Material and Methods

### **Ethics statement**

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation and the Federal Law 11.794 (10/2008). The institutional Scientific

Commission and the Committee for Animal Ethics of State University of Londrina (CEUA/UEL: 28105.2014.72) approved all the procedures used in the present study.

### **Moderate physical exercise protocol**

The treadmill training was performed on a low-speed, motor-driven rodent treadmill (KT-300 W, Inbramed, Porto Alegre, Brazil). For exercise adaptation, all mice were conditioned at 8 m/min, 10 min/day, for five days to become familiar with the treadmill environment. After this period, the treadmill ET was performed according to Ferreira and collaborators [24] for nine weeks. The room temperature was maintained at 20–22 °C during the training sessions. This physical exercise protocol is considered to require light or mild effort. The sedentary animal group remained in their home cage throughout the course of the experiment.

### **Animals, parasites, and experimental *T. cruzi* infection**

Four to twenty-week-old Swiss, male mice purchased from the Animal House of the State University of Londrina, Parana, Brazil, were used in this study. Mice were housed in standard clear plastic cages and kept at 21°C, with free access to food and water, and a light/dark cycle of 12:12 h. Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Quimtia-Nuvital, Colombo, Brazil) and sterilized water were provided ad libitum. The Swiss mice were randomly assigned into four groups: sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary infected (SI), and trained infected (TI). After the treadmill ET, experimental group mice were infected with  $5 \times 10^3$  trypomastigotes forms of Y strain (Type I) of *T. cruzi* [25]. Control group mice received PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.2). Parasites were obtained from the blood of infected mice, washed three times with phosphate-buffered saline by centrifugation, and inoculated intraperitoneally.

### **Parasitemia and survival rates**

Parasitemia curve and parasite peak were determined by collecting 5  $\mu$ L of blood samples from the tail of the animal, as described by Brenner et al[26]. The blood was collected daily beginning from the 3rd DPI until no parasites were observed (approximately 30 DPI), characterizing the acute phase of infection. Survival rates of control and experimental groups of mice were evaluated daily until 60 DPI.

### **Cardiac parasitism**

On 7, 14, and 20 DPI, SI and TI mice were euthanized by cervical dislocation in accordance with Committee on the Ethics of Animal Experiments at Londrina State University (CEEAA-UEL). For the euthanasia procedure, animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg body weight) and xylazine (5 mg/kg body weight). The heart of each mouse was removed, fixed in 10% buffered formalin, and then sectioned. Segments were paraffin embedded and sections were stained with hematoxylin/eosin (H&E) and analyzed by light microscopy. The number of parasite nests was counted in fifty microscope fields (400 $\times$  magnification) per tissue section. Three sections were evaluated, and the data expressed as the mean of the three sections.

### **Quantification of heart-infiltrating cells**

The total number of nucleated cells was counted in fifty microscopic fields in at least four representatives, nonconsecutive, HE-stained sections (7 $\mu$ m thickness) from each mouse. Sections were examined using a Zeiss Integrationsplatte II eyepiece (Zeiss Co, Oberkochen, Germany) reticule, using a microscope at a final magnification of 1000X. Images were analyzed using the software ImageJ v1.49 (National Institute of Health, USA).

### **NO quantification**

NO concentration in plasma and heart tissue was obtained from SC, TC, SI, and TI groups of mice at 7, 14, and 20 DPI. NO was estimated by measuring nitrite, as described previously [27, 28]. All reagents for the nitrite assay were obtained from Sigma Chemical Co.

### **Level of plasma cytokines**

Interleukin (IL)-6, IL-10, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor (TNF), and IL-12p70 were determined by cytometric bead array (BD™ CBA mouse inflammation Kit, San Jose, CA, USA). Briefly, 50- $\mu$ L plasma samples were subjected to analysis in duplicate using the cytometric bead array kit on a C5 cytometry. The concentration of plasma cytokines was quantified using FCAP Array™ v. 3.01, SoftFlow ©. The theoretical limits of detection were 5pg/mL for all cytokines.

### **Non-invasive cardiovascular measurements**

The heart rate (HR) and mean arterial blood pressures (MAP) were measured by CODA Mouse & Rat Tail-Cuff Blood Pressure System (KENT Scientific CO., Connecticut, USA) in conscious mouse from the SC, TC, SI and, TI groups at 7, 14, 20 DPI and the mean value was calculated for each mouse.

### **Statistical analysis**

The results were expressed as arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparison between groups was carried out via two-way ANOVA followed by Tukey's and/or Sidak's test, when appropriate. Survival rate was determined by Gehan-Breslow-Wilcoxon test using GraphPad Prism Software version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### **Treadmill exercise performance**

As shown in Fig. 1, initially (week 0) the exercise performance test showed no significant difference between sedentary ( $25.15 \pm 2.06$  m/min) and trained ( $27.50 \pm 1.06$  m/min) mice. At the end of week 5 and 9, trained animals performed better than animals of the sedentary group ( $35.62 \pm 0.99$  vs.  $24.09 \pm 1.42$  m/min,  $P < 0.0001$ ;  $36.97$  vs.  $25.75 \pm 1.10$  m/min,  $P < 0.0001$ , respectively). When we analyzed the results obtained in the nine weeks; no statistical difference was observed in the performance of sedentary mice during this period (Fig. 1). However, trained mice had an improvement in performance ( $27.5 \pm 1.06$  m/min to  $35.62 \pm 0.99$  m/min between week 0 and 5), reaching a maximum speed of  $36.97 \pm 0.97$  m/min (week 9,  $P < 0.0001$ ).

### **Cardiovascular parameters during exercise training**

ET induced resting bradycardia was observed in the trained groups compared to their respective sedentary groups (week 9, Fig. 2A,  $P < 0.05$ ). No changes were observed in the mean arterial pressure (MAP) in the trained group when compared to the sedentary group (Fig. 2B).

### **Effect of treadmill exercises on course of *T. cruzi* infection**

The parasitemia curve showed a characteristic profile of the Y strain of *T. cruzi* in the two infected groups. Thirteen days following inoculation with *T. cruzi*, parasitemia was similar between the two groups. The parasite peaks occurred on 15 and 17 DPI and were lower in the trained group compared to the sedentary group (Fig. 3A,  $P < 0.05$  to 15 and 17 DPI,  $P < 0.001$ ). There were significant differences in survival between the two groups (Fig. 3B,  $P < 0.05$ ). It was observed that none of the animals in the sedentary group survives after 22 DPI, with mortality beginning at 17 DPI, while 22% of all mice in the trained group survive until 60 DPI (Fig. 3B).

### **Effects of treadmill exercise on parasitism and inflammatory infiltrate in the heart of infected mice**

As expected, *T. cruzi* infection increased the cardiac parasitism in heart tissue of mice (Fig. 4A, B). There was a significant reduction in cardiac parasitism (20 DPI, Fig. 4B,  $P < 0.05$ ) of trained mice when compared with sedentary mice.

The total number of nuclei per 200  $\mu\text{m}^2$  section of heart tissue was determined. *T. cruzi* infection increased the number of inflammatory cells in the heart tissue of sedentary mice at 7 DPI ( $1393.25 \pm 32.52$  vs.  $924.32 \pm 50.1$ ,  $P < 0.05$ ), 14 DPI ( $1346.92 \pm 90.80$  vs.  $854.75 \pm 50.07$ ,  $P = 0.003$ ), and 20 DPI ( $1699.14 \pm 96.86$  vs.  $797.77 \pm 29.93$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 5A) when compared with sedentary uninfected mice.

The number of nuclei per section of heart tissue at 7 and 20 DPI was higher in sedentary-infected mice ( $1393.25 \pm 32.55$ ;  $1699.14 \pm 96.87$ ) than in trained-infected mice ( $873.99 \pm 42.43$ ;  $1194.01 \pm 128.75$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 5A). It is noteworthy that by microscopic analysis, the inflammatory infiltrates found in all infected mice was characterized by mononuclear cells and the scarce presence of polymorphonuclear cells. Furthermore, no differences were detected in the cellular composition of the myocarditis between the infected mice at 14 DPI (Fig. 5B).

### **Effects of treadmill exercise on cardiovascular parameters during infection**

In evaluating the cardiovascular parameters post infection, we observed that HR remained the same in all groups 7 DPI. However, at 14 DPI, the sedentary infected animals presented bradycardia compared to sedentary uninfected mice ( $699.42 \pm 15.93$  vs.  $782.95 \pm 22.30$  bpm,  $P < 0.05$ ). At 20 DPI, we observed that the average HR of sedentary infected mice remained lower compared to that in trained infected mice ( $699.73 \pm 42.37$  vs.  $742.11 \pm 25.35$  bpm,  $P < 0.05$ ). However, trained-infected mice did not present bradycardia at 14 and 20 DPI, similar to non-infected mice (Fig. 6A).

We observed no statistical difference in MAP between groups of animals at 7 DPI. However, at 14 DPI we observed a decrease in MAP in infected animals compared to their respective control animals (sedentary:  $73.92 \pm 4.28$  vs.  $88.85 \pm 3.60$  mmHg,  $P < 0.05$ ; and trained:  $73.45 \pm 3.69$  vs.  $91.48 \pm 4.67$  mmHg,  $P < 0.05$ ). The MAP of infected animals was lower compared to the first evaluation at 7 DPI. At 20 DPI, we did not find a statistical difference in MAP between groups. However, there was a slight recovery in the most marked hypotension in the trained and infected animals without presenting statistical difference (Fig. 6B).

### **Nitric oxide production**

Compared to control, the plasma NO levels of acutely (14 to 20 DPI) infected mice were significantly increased (Fig. 7A,  $P < 0.0001$ ). No change in plasma NO levels was observed in trained-infected mice compared to sedentary-infected mice ( $P > 0.05$ , Fig. 7A). However, the NO levels in the heart of sedentary-infected mice were higher than in uninfected mice (20 DPI, Fig. 7B,  $P < 0.0001$ ). The NO levels in the heart of trained-infected mice decreased when compared to sedentary-infected mice (20 DPI,  $P < 0.0001$ , Fig. 7B).

### **Plasma cytokines**

A significant increase of pro-inflammatory cytokines (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-10) and MCP-1 was observed in the plasma of sedentary-infected mice ( $P < 0.0001$  Fig. 8). Moreover, IL-6 was not detectable in plasma of mice from control and infected groups (data not shown). A significant decrease of IL-12 (14DPI), TNF- $\alpha$  (7 and 14DPI), IFN- $\gamma$  (14DPI), and MCP-1 (14DPI) in plasma was observed in a trained-infected group versus the control group ( $P < 0.0001$ , Fig. 8A-D). However, no difference was observed for IL-10 (Fig. 8E,  $P > 0.05$ ).

## Discussion

The results of the present study suggest that previous ET plays a preventive role in resistance against *T. cruzi* infection by modulating the inflammatory reaction and NO levels of infected mice. Furthermore, changes in HR and arterial pressure during the acute phase of *T. cruzi* infection, correlating with nitric oxide in cardiac tissue and plasma, were observed, which have not been previously described.

The treadmill exercise protocol used in this study improved the performance of the trained mice compared with the sedentary, corroborating the results obtained by Hoydal and collaborators [29]. In fact, moderate physical activity is correlated with positive effects on the cardiovascular system [30]. It provides several cardiovascular benefits including the refurbishment of the heart and skeletal muscle [31, 32], and improvements in the autonomic control of the heart [33]. Furthermore, the appearance of resting bradycardia is a characteristic marker of ET [33, 34], which was also found in our work at the end of the 9<sup>th</sup> week of training. Finally, benefits to the cardiovascular system via central and peripheral mechanisms are also evident from the action of moderate physical activity [30].

The average blood pressure of trained and sedentary mice remained unchanged throughout the physical training protocol, corroborating the findings of other authors [35-37]. However, during infection we observed that sedentary mice presented a stable control of arterial pressure variation as infection progressed, but exhibited dramatic oscillations of HR after peak parasitemia. The MAP of sedentary- and trained-infected mice dropped from levels ranging 80–90 mmHg at 7 DPI to 70–80 mmHg at 14 DPI, further decreasing as infection progressed, while also coinciding with increasing NO levels in the plasma. These results suggest that NO may be responsible for the arterial pressure alterations during acute *T. cruzi* infection, considering its well-known role in vasodilatation [38]. Similar results were found in another study, where high levels of NO during infection by *T. cruzi* were correlated with low

blood pressures. After treatment with an iNOS inhibitor (1400W), the arterial pressure was normalized. However, HR was not evaluated in this study [39].

An adequate production of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, and IL-6 is essential for controlling infection by intracellular parasites. To resolve the *T. cruzi* infection, a balance is necessary between the immune response mediated by TH1 and TH2. In this regard, we observed that trained animals had a significant decrease of pro-inflammatory cytokines as IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ . We also detected an increased NO production in the heart of TI mice, which suggests a possible involvement of these molecules in the injury of the myocardial tissue. Interestingly, the ET also decreased NO level in the heart of infected mice, suggesting a protective mechanism against myocardial injury. The increased NO levels in the heart of infected mice may be responsible for the decreased HR observed at 14 and 20 DPI, which was reverted by previous ET. The source of this NO in *T. cruzi*-infected mice has been evaluated before, and may be derived from iNOS [28]. We speculate that ET abrogates the iNOS activation during *T. cruzi* infection, and may increase the activity of constitutive NOS, collaborating as an anti-inflammatory agent in the heart. However, further studies are necessary to investigate this hypothesis.

The diminished production of pro-inflammatory cytokines in the trained group was associated with higher survival rates, and suggests that both NO and pro-inflammatory cytokines are involved in the fatal outcome of the sedentary-infected mice. Moreover, we observed that the ratio of IFN- $\gamma$  to IL-10 was lower in trained mice than in the sedentary-infected mice (data not shown). Our results suggest that, in trained infected animals, the protective action of IFN- $\gamma$  could be more effective in the presence of the antagonistic action of IL-10, reducing the inflammatory infiltration. Inflammatory infiltration was also reduced in trained-infected animals due to a decreased production of cytokines and chemokines. These results are consistent with those of Reed and collaborators [40], who observed a lower IL-10

production in resistant mice compared to the susceptible ones. Furthermore, Abrahamsohn and collaborators [41] observed a lower number of parasites and higher IFN- $\gamma$  production in IL-10 knockout (KO) mice than in the wild-type (WT) mice. However, *T. cruzi*-infected IL-10 KO mice, although having lower blood and tissue parasitism, did not survive longer, and often died slightly earlier than either infected WT or RAG KO mice. The trained mice in our study survive longer than sedentary probably due to IL-10 protection from INF- $\gamma$  deleterious effects [41].

Overall, we demonstrated that our experimental model promoted beneficial effects in the heart tissue. Histopathological evaluation showed differences in the inflammatory infiltrate, which was observed to be lower in the trained group. Similar results on the effects of physical exercise in chagasic animals were obtained in the enteric nervous system [10-12]. The direct actions of the parasite in the cardiac muscle in the above parameters have not been previously reported in the literature. Finally, our results suggest that the application of moderate physical training had positive effects towards the prevention against *T. cruzi* infection and minimized the injury caused by the parasite, reminiscent of results to those of the uninfected control group. Further studies are needed to determine whether such activities can contribute to functional improvement of the heart muscle in the Chagas disease.

In conclusion, our results show that moderate ET produced a profile of NO and cytokines different from that of the sedentary infected mice, with a delicate balance between TH1 and TH2, suitable for overcoming the infection. The positive effects of moderate aerobic ET can attend as a prophylactic action on inflammation that occurs in the early stages of *T. cruzi* infection.

## References

1. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1(2):59.
2. Imai K, Maeda T, Sayama Y, Osa M, Mikita K, Kurane I, et al. Chronic Chagas disease with advanced cardiac complications in Japan: Case report and literature review. Parasitol Int. 2015;64(5):240-2. doi: 10.1016/j.parint.2015.02.005. PubMed PMID: 25744336.
3. Jackson Y, Pinto A, Pett S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. Trop Med Int Health. 2014;19(2):212-8. doi: 10.1111/tmi.12235. PubMed PMID: 24299280.
4. Pinto A, Pett S, Jackson Y. Identifying Chagas disease in Australia: an emerging challenge for general practitioners. Aust Fam Physician. 2014;43(7):440-2. PubMed PMID: 25006603.
5. WHO. World Health Organization. Fact Sheet No 340. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> [Accessed November, 20, 2015]. 2015.
6. Scharfstein J, Andrade D. Infection-associated vasculopathy in experimental Chagas disease pathogenic roles of endothelin and kinin pathways. Advances in parasitology. 2011;76:101-27. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00005-0. PubMed PMID: 21884889.
7. Clayton J. Chagas disease 101. Nature. 2010;465(7301):S4-5. doi: 10.1038/nature09220. PubMed PMID: 20571553.
8. Gaspar L, Moraes CB, Freitas-Junior LH, Ferrari S, Costantino L, Costi MP, et al. Current and Future Chemotherapy For Chagas Disease. Curr Med Chem. 2015. PubMed PMID: 26477622.
9. Júnior JCMS. Megacólon: Parte II. Doença de Chagas. Rev Bras Med Coloproctologia. 2002;4.
10. Moreira NM, Zanoni JN, de Oliveira Dalalio MM, de Almeida Araujo EJ, Braga CF, de Araujo SM. Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. Experimental Parasitology. 2014;141:68-74. doi: 10.1016/j.exppara.2014.03.005. PubMed PMID: 24667137.
11. Moreira NM, Santos F, Toledo MJ, Moraes SM, Araujo EJ, Sant'Ana D, et al. Moderate physical exercise reduces parasitaemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. International journal of experimental pathology. 2013;94(6):426-35. doi: 10.1111/iep.12049. PubMed PMID: 24205797; PubMed Central PMCID: PMC3944454.

12. Moreira NM, de Moraes SM, Dalalio MM, Gomes ML, Sant'ana DM, de Araujo SM. Moderate physical exercise protects myenteric metabolically more active neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Dig Dis Sci. 2014;59(2):307-14. doi: 10.1007/s10620-013-2901-9. PubMed PMID: 24185679.
13. Schebeleski-Soares C, Occhi-Soares RC, Franzoi-de-Moraes SM, de Oliveira Dalalio MM, Almeida FN, de Ornelas Toledo MJ, et al. Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Appl Physiol Nutr Metab. 2009;34(4):659-65. doi: 10.1139/H09-053. PubMed PMID: 19767801.
14. Nagatomi R. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. Exerc Immunol Rev. 2006;12:54-71. PubMed PMID: 17201072.
15. Oliveira GM, Masuda MO, Rocha NN, Schor N, Hooper CS, Araujo-Jorge TC, et al. Absence of Fas-L aggravates renal injury in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(8):1063-71. PubMed PMID: 20140366.
16. Morvan E, Lima NE, Machi JF, Mostarda C, De Angelis K, Irigoyen MC, et al. Metabolic, hemodynamic and structural adjustments to low intensity exercise training in a metabolic syndrome model. Cardiovasc Diabetol. 2013;12:89. doi: 10.1186/1475-2840-12-89. PubMed PMID: 23777435; PubMed Central PMCID: PMC3697989.
17. Chrysohoou C, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Kokkinos PF, Stefanadis C, Toutouzas P. The association between physical activity and the development of acute coronary syndromes in treated and untreated hypertensive subjects. J Clin Hypertens (Greenwich). 2003;5(2):115-20. PubMed PMID: 12671323.
18. Kokkinos PF, Narayan P, Papademetriou V. Exercise as hypertension therapy. Cardiol Clin. 2001;19(3):507-16. PubMed PMID: 11570120.
19. Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infection and immunity. 1994;62(11):5177-82. PubMed PMID: 7523307; PubMed Central PMCID: PMC303244.
20. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. PLoS neglected tropical diseases. 2010;4(2):e604. doi: 10.1371/journal.pntd.0000604. PubMed PMID: 20169058; PubMed Central PMCID: PMC32821906.
21. Perez-Fuentes R, Guegan JF, Barnabe C, Lopez-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. International journal for parasitology. 2003;33(3):293-9. PubMed PMID: 12670514.
22. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. International immunopharmacology. 2001;1(8):1457-67. PubMed PMID: 11515811.
23. Elahi MM, Naseem KM, Matata BM. Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. FEBS J. 2007;274(4):906-23. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05660.x. PubMed PMID: 17244198.

24. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(8):760-5. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x. PubMed PMID: 17600553.
25. Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre a cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinical Biology*. 1953;20:191-208.
26. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1962;4:389-96. PubMed PMID: 14015230.
27. Navarro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clinical chemistry*. 1998;44(3):679-81. PubMed PMID: 9510886.
28. Panis C, Mazzuco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakihara VL, Yamauchi LM, et al. *Trypanosoma cruzi*: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Experimental Parasitology*. 2011;127(1):58-65. doi: 10.1016/j.exppara.2010.06.030. PubMed PMID: 20599987.
29. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;14(6):753-60. doi: 10.1097/HJR.0b013e3281eacef1. PubMed PMID: 18043295.
30. Martins-Pinge MC. Cardiovascular and autonomic modulation by the central nervous system after aerobic exercise training. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(9):848-54. PubMed PMID: 21956530.
31. DiCarlo SE, Bishop VS. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. *Am J Physiol*. 1990;258(1 Pt 2):H212-20. PubMed PMID: 1967912.
32. Mack GW, Thompson CA, Doerr DF, Nadel ER, Convertino VA. Diminished baroreflex control of forearm vascular resistance following training. *Med Sci Sports Exerc*. 1991;23(12):1367-74. PubMed PMID: 1798379.
33. Brum PC, Da Silva GJ, Moreira ED, Ida F, Negrao CE, Krieger EM. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;36(6):1018-22. PubMed PMID: 11116118.
34. Negrao CE, Irigoyen MC, Moreira ED, Brum PC, Freire PM, Krieger EM. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. *Am J Physiol*. 1993;265(2 Pt 2):R365-70. PubMed PMID: 8368390.
35. Negrao CE, Moreira ED, Santos MC, Farah VM, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol* (1985). 1992;72(5):1749-53. PubMed PMID: 1601782.

36. De Angelis KL, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG, et al. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension*. 1997;30(3 Pt 2):767-71. PubMed PMID: 9323020.
37. De Angelis K, Wichi RB, Jesus WR, Moreira ED, Morris M, Krieger EM, et al. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. *J Appl Physiol* (1985). 2004;96(6):2174-8. doi: 10.1152/jappphysiol.00870.2003. PubMed PMID: 14729725.
38. Moncada S, Higgs EA, Palmer RM. Characterization and biological significance of endothelium-derived relaxing factor. *Biochemical Society transactions*. 1988;16(4):484-6. Epub 1988/08/01. PubMed PMID: 3061850.
39. Santiago HC, Gonzalez Lombana CZ, Macedo JP, Utsch L, Tafuri WL, Campagnole-Santos MJ, et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1492. doi: 10.1371/journal.pntd.0001492. PubMed PMID: 22348160; PubMed Central PMCID: PMC3279332.
40. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of immunology*. 1994;153(7):3135-40. PubMed PMID: 8089491.
41. Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology*. 1996;84(2):231-44. doi: 10.1006/expr.1996.0109. PubMed PMID: 8932773.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgments**

We would like to thank, FAEPE (Fundo de Auxílio ao Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Londrina, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the fellowship to LCM, PPF, and MCMP.

## Figure Legends

### **Fig.1. Trained mice have significantly higher maximal speed values than sedentary mice.**

The experimental groups were composed of 60 trained mice and 60 sedentary mice. \*\*\*\* $P < 0.0001$  comparing trained group with sedentary group for each week. #  $P < 0.0001$  comparing in trained group between week 0, 5 and 9.

### **Fig.2. Exercise training-induces decrease in heart rate (HR) in the trained group compared to their respective sedentary group. (A) HR, (B) mean arterial pressure (MAP)**

at 0, 5, and 9 weeks of treadmill exercise training. No changes were observed in MAP of the trained group when compared to the sedentary group. The experimental groups were composed of 27 trained mice and 14 sedentary mice. \* $P < 0.05$  comparing trained with sedentary at week 9.

### **Fig.3. Effect of treadmill exercises on the course of *T. cruzi* infection in mice.**

Parasitemia and survival were determined in Swiss mice infected with  $5 \times 10^3$  blood trypomastigotes *T. cruzi* (Y strain) two days after the end of the physical activity protocol. (A) Parasitemia was quantified as trypomastigotes per milliliter of blood. The data (mean  $\pm$  SEM) are representative of two independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$  comparing trained versus sedentary mice. (B) Survival rate was determined by Gehan-Breslow-Wilcoxon test. The experimental groups were composed of five mice per group. \* $P < 0.05$  comparing trained mice with sedentary mice.

### **Fig.4. Treadmill exercises control parasite proliferation in the heart.**

Swiss mice infected with *T. cruzi* were sacrificed on 7, 14, and 20 days post-infection (DPI) and tissue parasitism

in the heart evaluated as described in material and methods. (A) Representative microphotographs (original magnification X 400) of cardiac tissue of mice at 20 DPI is shown. (B) Bars represent mean  $\pm$  SEM of five animals per group.  $*P < 0.05$  comparing trained and sedentary animals at 20 DPI.

**Fig.5. Treadmill exercise decreases *T. cruzi*-induced heart pathology.** (A) Quantification of nuclei in the heart tissue of uninfected sedentary and trained mice and infected sedentary and trained mice 7,14, and 20 days post-infection (DPI). (B) Representative microphotographs (original magnification X 400) of cardiac tissues of mice at 7, 14, and 20 DPI are shown. Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of two independent experiments using five mice per group.  $*P < 0.05$  comparing sedentary-infected mice with trained infected mice.  $***P < 0.001$  comparing sedentary-infected mice with trained-infected mice.  $^{\#}P < 0.05$  comparing sedentary infected with sedentary uninfected mice. Days post infection (DPI), Sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary infected (SI), and trained infected (TI).

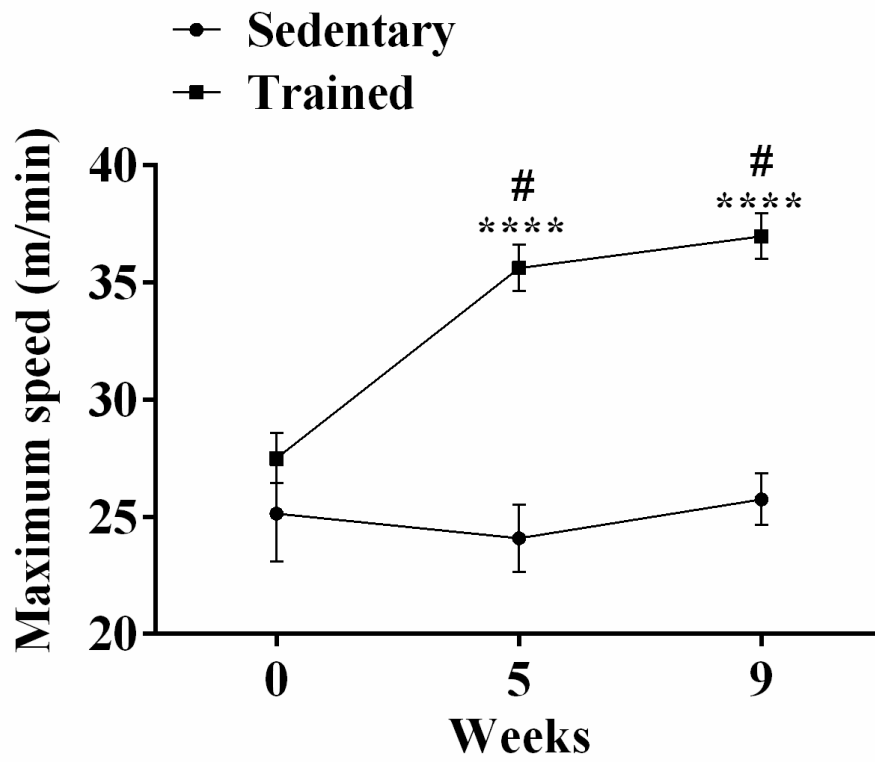
**Fig.6. Effect of exercise training on cardiovascular parameters after *T. cruzi* infection.**

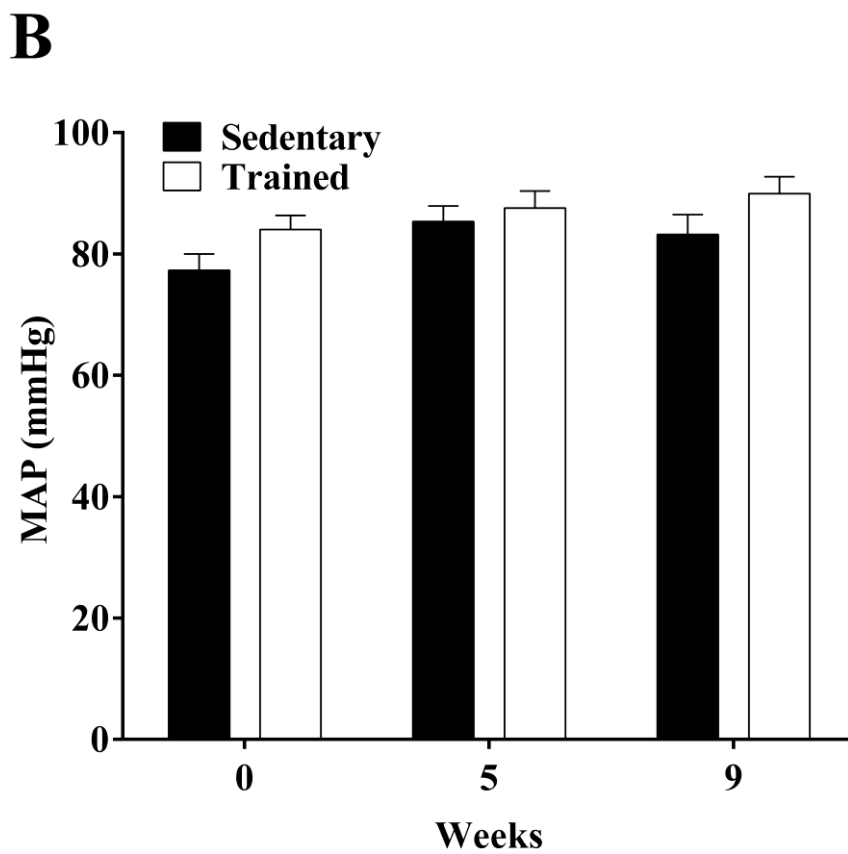
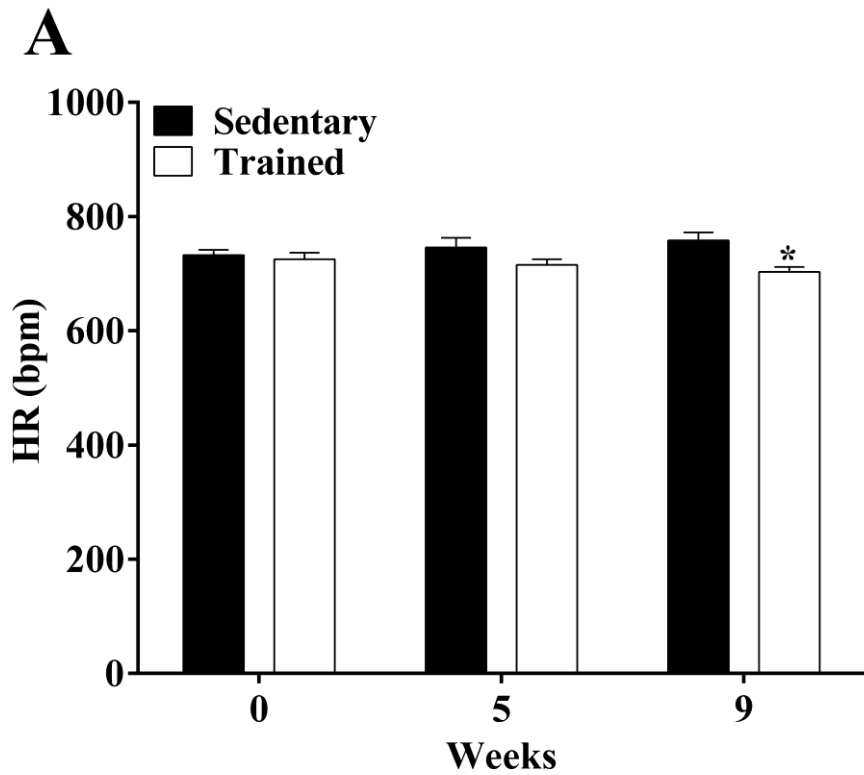
(A) Heart rate (HR),  $*P < 0.05$  comparing sedentary not-infected with sedentary infected (14 DPI);  $*P < 0.05$  comparing sedentary infected (20 DPI) with sedentary infected (7 DPI) and  $^{\#}P < 0.05$  comparing sedentary infected (20 DPI) with trained infected (20 DPI). (B) Mean arterial pressure.  $*P < 0.05$  comparing sedentary infected (14 DPI) and trained infected (14 DPI) with sedentary infected (7 DPI) and trained infected (7 DPI);  $^{\#}P < 0.05$  comparing

sedentary infected (14 DPI) and trained infected (14 DPI) with non-infected and age matched control mice. Days post infection (DPI), ten mice per group.

**Fig.7. Treadmill exercise modulates nitric oxide (NO) production.** Sedentary and trained mice infected or not with *T. cruzi* were bled at 7, 14, and 20 days post-infection (DPI) for NO measurements. NO was estimated by measuring nitrite levels via the cadmium–copper system followed by Griess reaction, as described in material and methods. (A) Levels of NO in the plasma. \*\*\*\* $P < 0.0001$  comparing infected mice (14 and 20 DPI) with infected (7 DPI) and non-infected age matched control mice, five mice per group. (B) Levels of NO in the heart.  $P < 0.0001$  comparing sedentary infected with sedentary uninfected and trained infected mice.

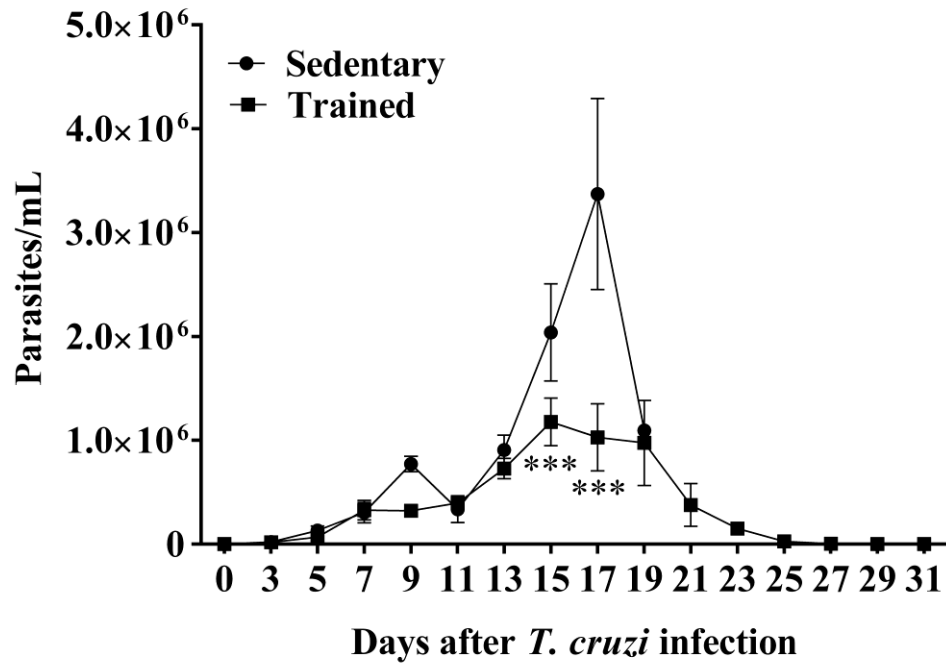
**Fig.8. Effect of treadmill exercises on pro-inflammatory cytokines in infected mice.** (A) IL-12, (B) TNF- $\alpha$ , (C) INF- $\gamma$ , (D) MCP-1 and (E) IL-10 plasma levels were quantified using the BD CBA mouse inflammation kit for a flow cytometer. The data show the mean  $\pm$  SEM of five mice per group and are representative of two independent experiments. \*\*\*\* $P < 0.0001$  comparing sedentary infected with trained infected.

**Fig.5.** Running speed of Swiss mice

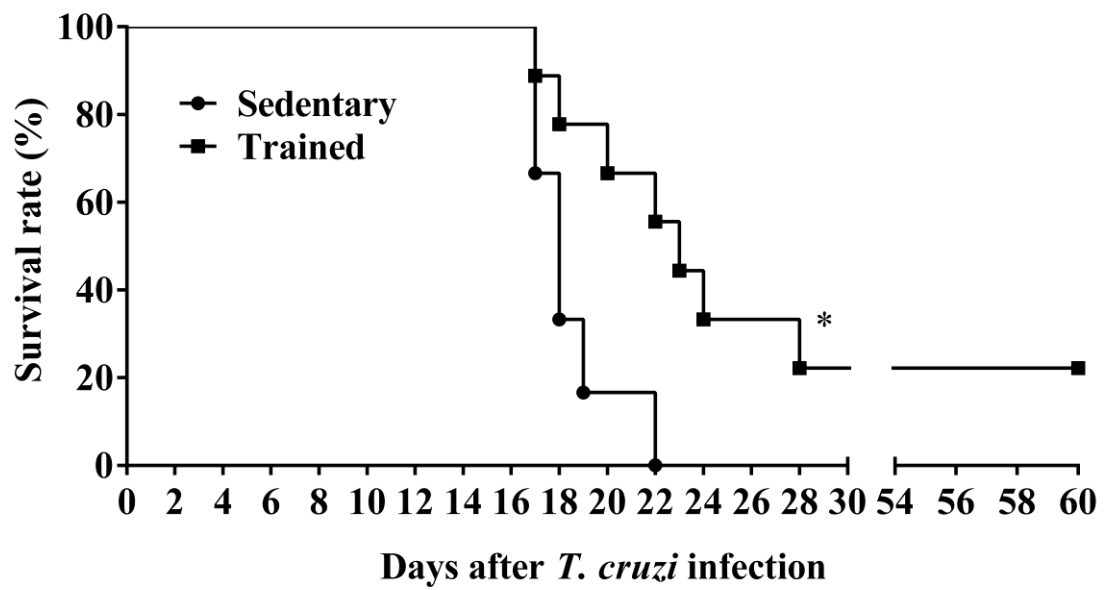
**Fig.6.** Cardiovascular parameters during exercise training

**Fig.7.** Effect of treadmill exercises on course of *T. cruzi* infection

**A**

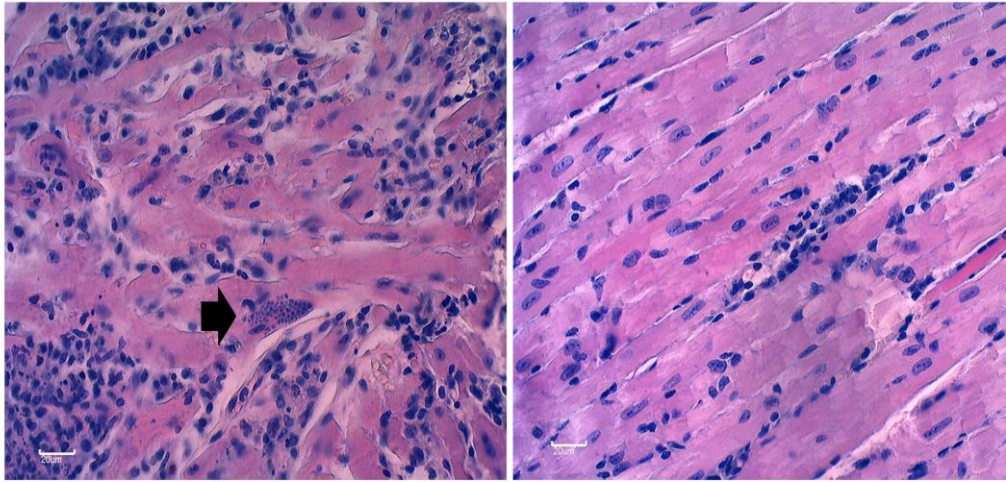


**B**



**Fig.8.** Treadmill exercises control parasite proliferation in the heart

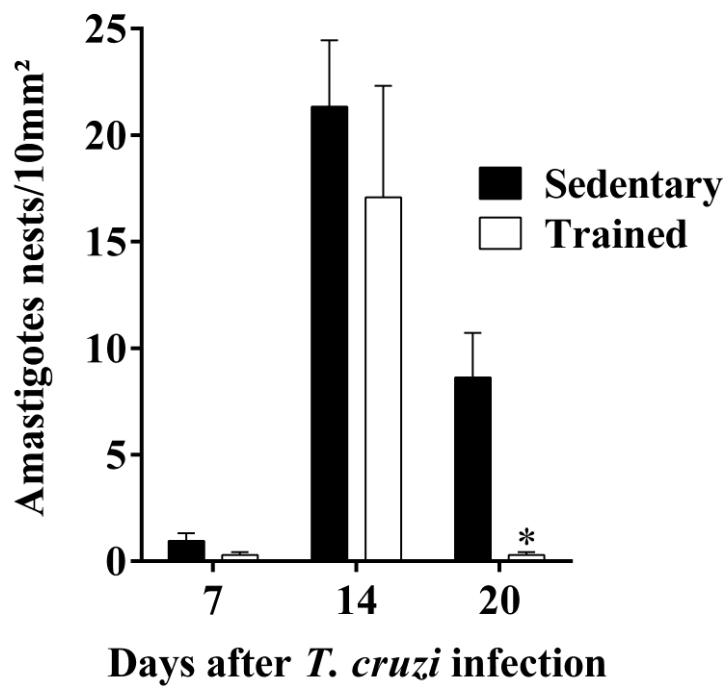
**A**



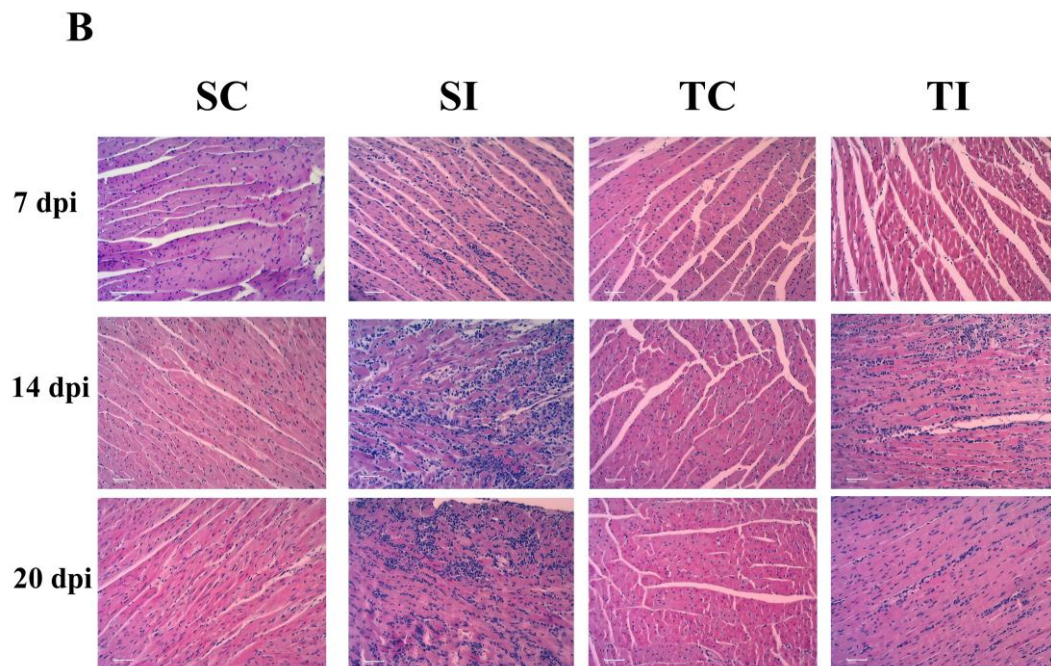
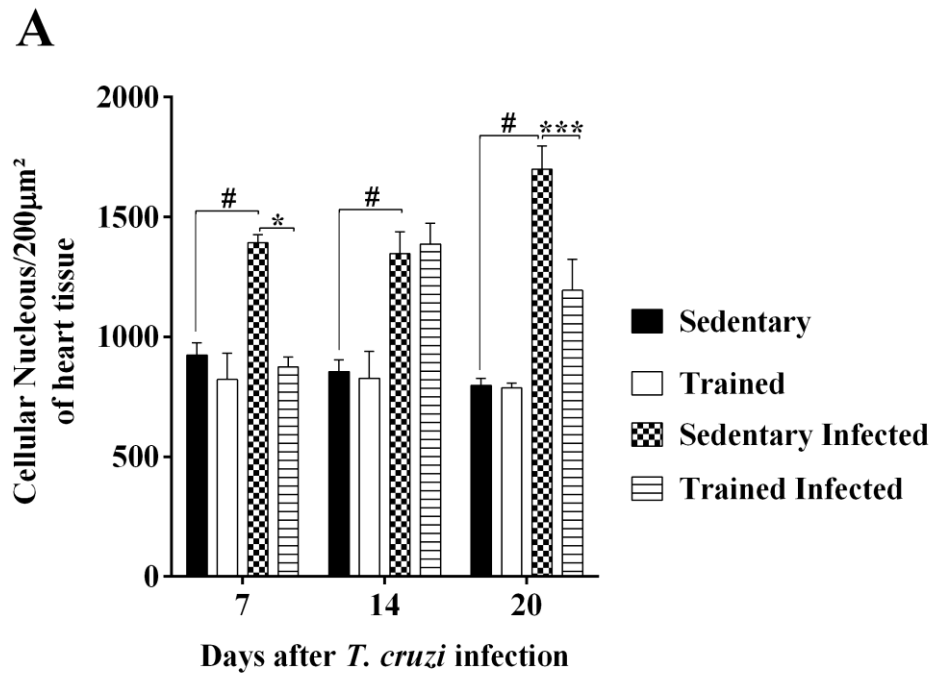
**Sedentary infected**

**Trained infected**

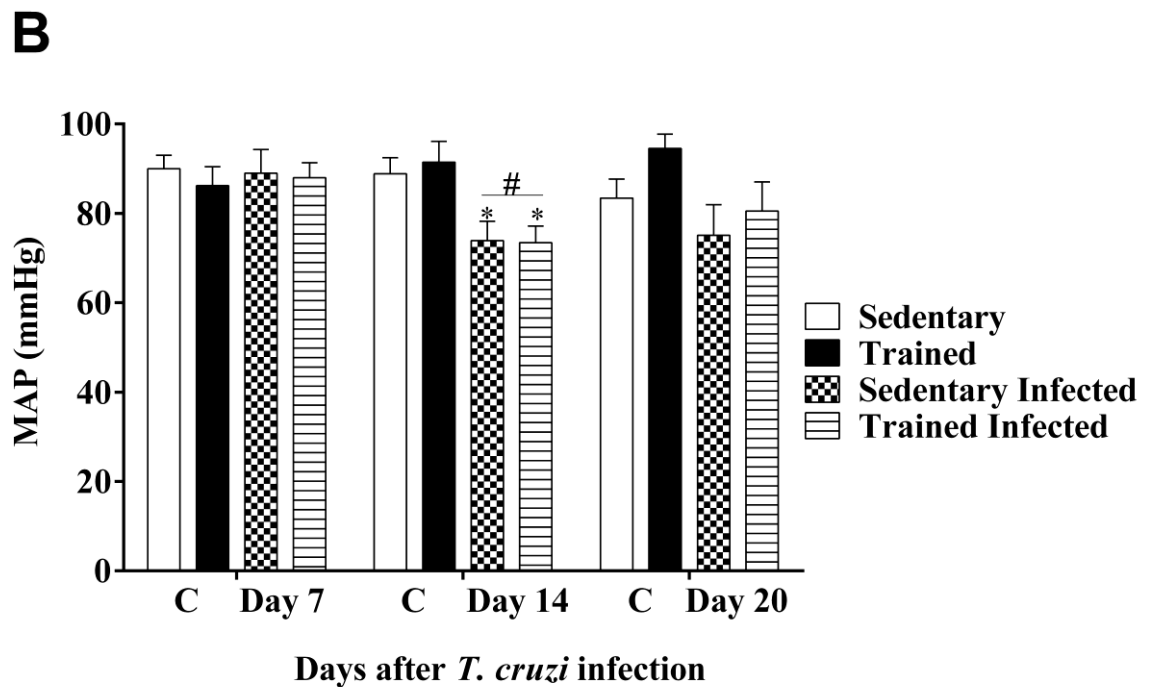
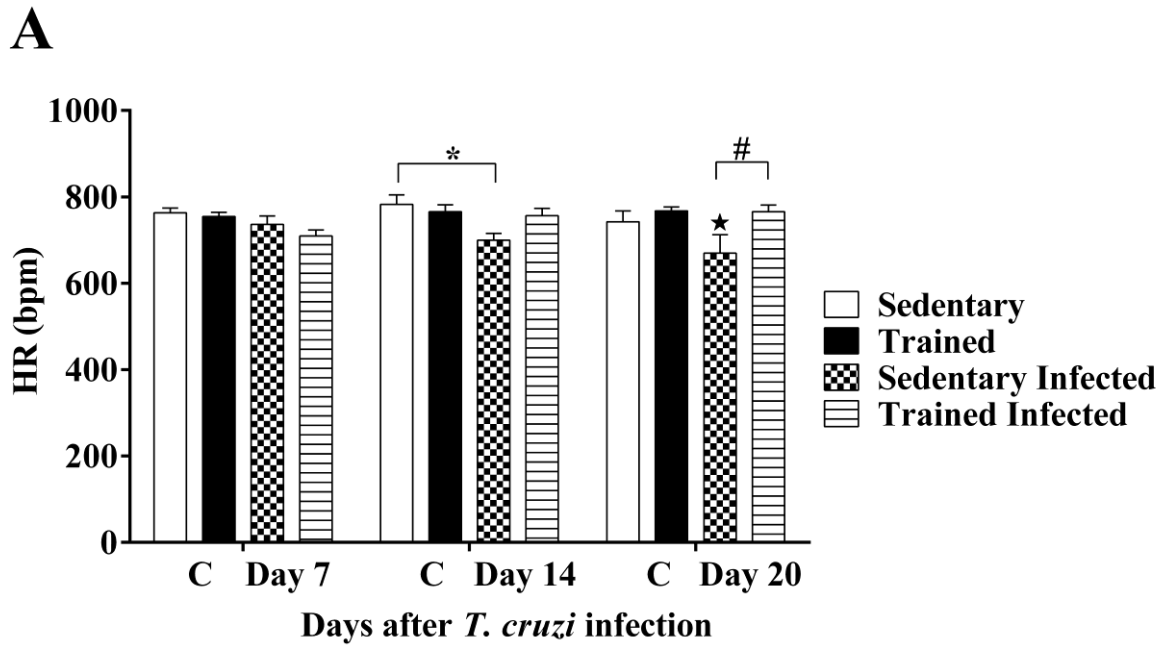
**B**



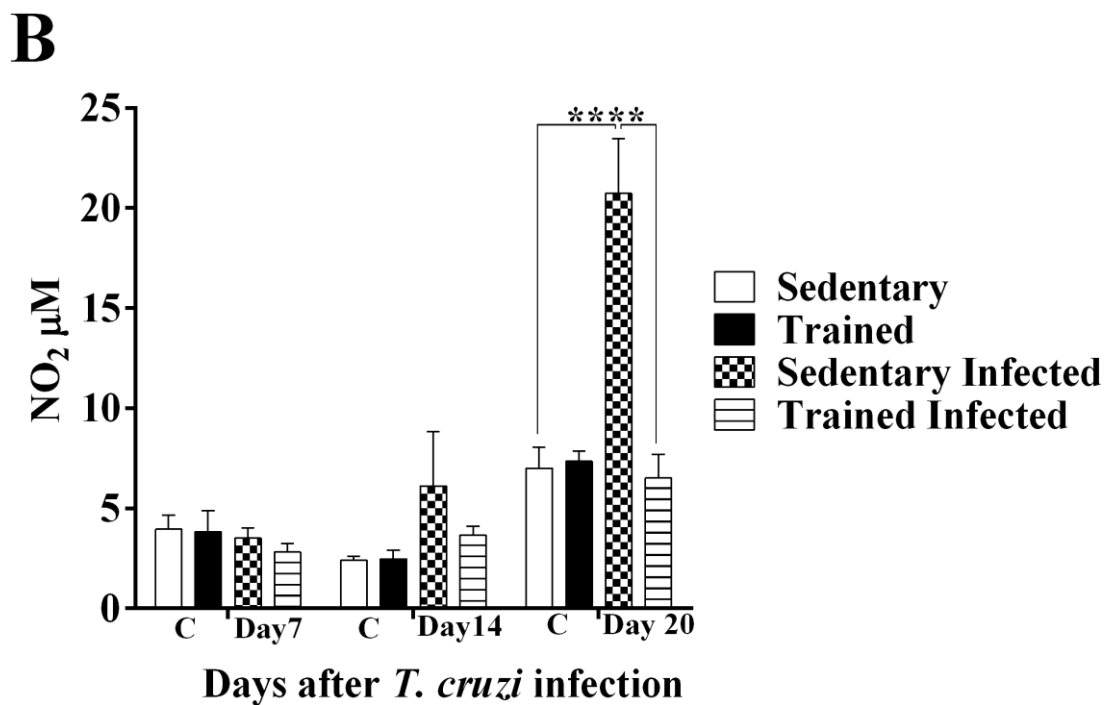
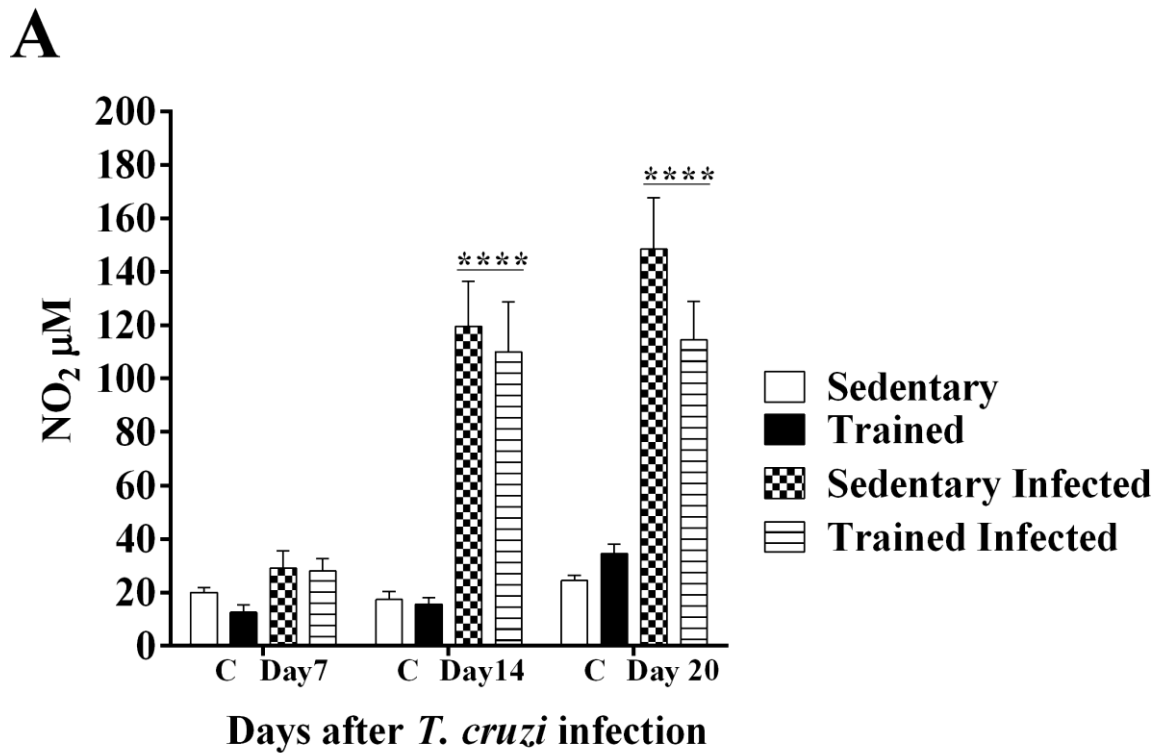
**Fig.9.** Treadmill exercise decreases *T. cruzi*-induced heart pathology



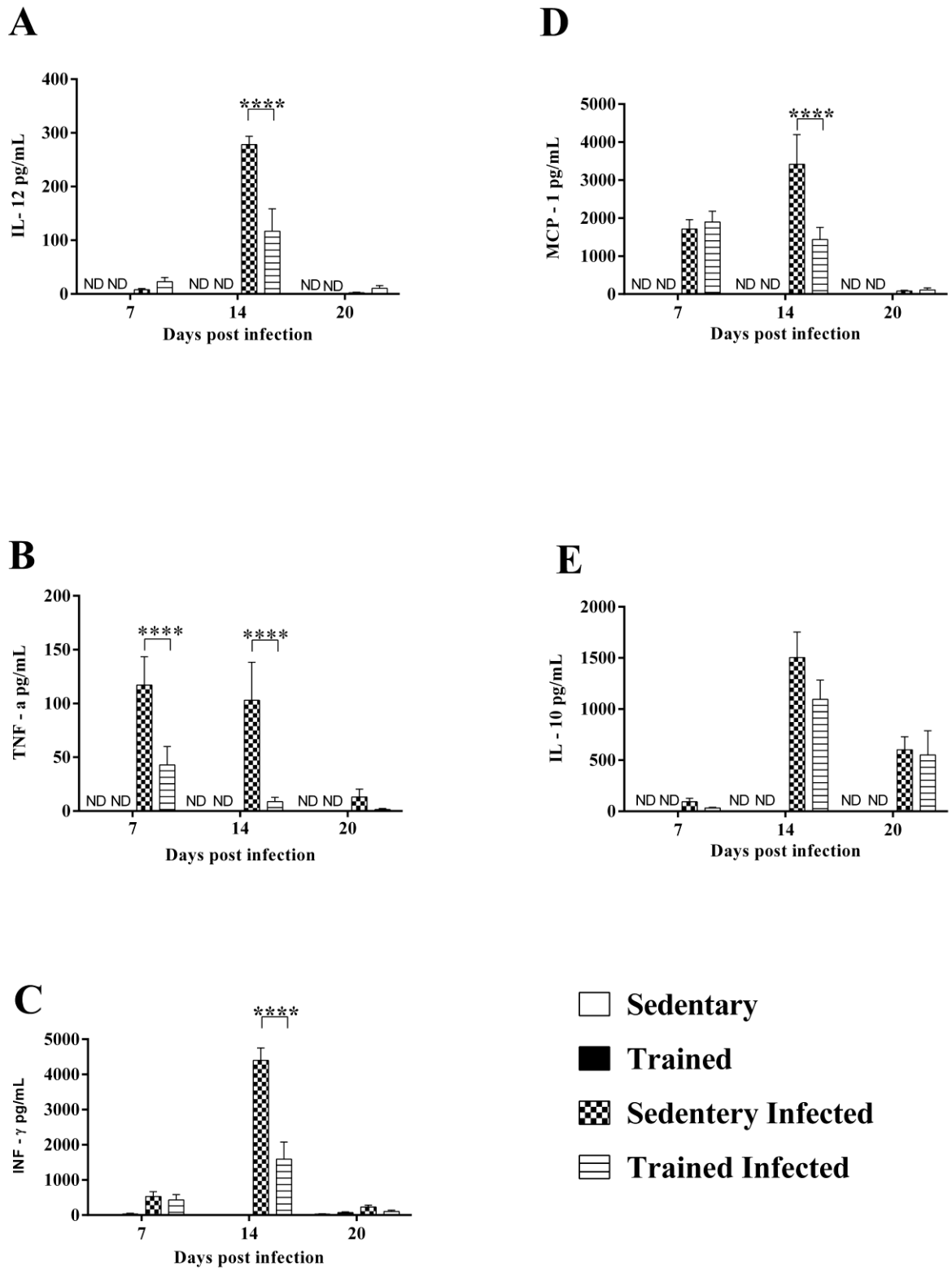
**Fig.10.** Effect of exercise training on cardiovascular parameters after infection



**Fig.11.** Treadmill exercise modulates nitric oxide production



**Fig.12.** Effect of treadmill exercises on proinflammatory cytokines in infected mice



## 5 CONCLUSÃO

Nossos dados confirmam a eficácia do protocolo de atividade física utilizado, foi encontrado uma melhora da performance e bradicardia de repouso nos animais treinados em relação aos sedentários ao final do protocolo de atividade física.

A atividade física de intensidade moderada atuou modulando a resposta imunológica e fisiopatológica na fase aguda da infecção por *T. cruzi* em camundongos. Os animais treinados apresentaram um pico de parasitemia atenuado pela atividade física nos dias 15 e 17 pós infecção e maior sobrevivência em relação aos animais sedentários. Foi observado uma melhora dos parâmetros cardiovasculares, o treinamento físico foi capaz de impedir a queda da frequência cardíaca proporcionada pela fase aguda da infecção. Em relação a pressão arterial média não encontramos interferências da atividade física.

Nossos resultados mostram como a atividade física foi capaz de modular a infecção, principalmente no coração dos camundongos, onde foi constatado uma redução na produção de NO, associada com redução da carga parasitária e menor infiltrado inflamatório.

O treinamento físico atenuou a produção plasmática de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6, IL-12, IFN) e da quimiocina MCP-1, porém não alterou a produção de IL-10 no plasma de animais infectados.

Nossos resultados indicaram que o treinamento físico prévio em camundongos gerou um perfil diferente de produção de NO e citocinas em relação aos animais sedentários, com um equilíbrio delicado entre o padrão Th1 e Th2, responsável pelo melhor controle da infecção. Os efeitos positivos do treinamento físico de baixa intensidade podem compor ações profiláticas para a Doença de Chagas.

## 6 ELEMENTOS PÓS TEXTUAIS

### 6.1 CARTA SUBMISSÃO DO ARTIGO

#### PLOS ONE

#### Treadmill Exercise Training Modulates Nitric Oxide and Cytokine Production Improving Cardiovascular Response and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-16-28264
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Treadmill Exercise Training Modulates Nitric Oxide and Cytokine Production Improving Cardiovascular Response and Resistance to <i>Trypanosoma cruzi</i> Infection
<b>Short Title:</b>	Treadmill exercise and resistance to <i>T. cruzi</i> infection
<b>Corresponding Author:</b>	Marli Cardoso Martins-Pinge Universidade Estadual de Londrina Londrina, Please select an option below BRAZIL
<b>Keywords:</b>	Chagas disease; exercise training; nitric oxide; arterial pressure; heart rate
<b>Abstract:</b>	<p>There is evidence suggesting that exercise training (ET) acts as a factor towards resistance to <i>Trypanosoma cruzi</i> infection. However, the interaction between mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and nitric oxide (NO) during the acute phase of infection has not been elucidated yet. Swiss mice were randomly assigned into four groups (n = 10/group): sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary infected (SI), and trained infected (TI). ET was performed on the treadmill for nine weeks. These mice were then infected with <math>5 \times 10^3</math> trypomastigotes of <i>T. cruzi</i> (Y strain). We observed resting bradycardia and improved performance in trained animals compared with in sedentary ones. On the 20th day post-infection (DPI), we found a decrease in HR in SI animals compared to TI animals (<math>699.73 \pm 42.37</math> vs. <math>742.11 \pm 25.35</math> bpm, respectively, <math>P &lt; 0.05</math>). We also observed increased production of NO in cardiac tissue on the 20th DPI in the SI group, normalized in TI group (<math>20.73 \pm 2.74</math> vs. <math>6.51 \pm 1.19</math> <math>\mu\text{M}</math>, respectively). Plasma pro-inflammatory cytokines (IL-12, TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>) and MCP-1 were increased in SI animals, but decreased in TI animals. The increase in parasitemia on the 15th and 17th DPI in the SI group was attenuated in the TI group. TI animals also showed increased survival compared to SI animals. Our results suggest that previous ET plays a preventive role in resistance to <i>T. cruzi</i> infection, modulating cardiovascular aspects, inflammatory reaction, and NO levels of infected mice, thus promoting prevention benefits for Chagas disease.</p>
<b>Order of Authors:</b>	Bruno Fernando Cruz Lucchetti Nágela Ghabdan Zanluqui Hiviny de Ataiades Raquel Maria Isabel Lovo-Martins Vera Lúcia Hideko-Tatakihara Mônica de Oliveira Belém Lisete Compagno Michelini Eduardo José de Almeida Araújo Phileo Pinge-Filho Marli Cardoso Martins-Pinge

## 6.2 PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade  
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 009/2015

Londrina, 27 de Fevereiro de 2015

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 02 de Dezembro de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Manifestações cardíacas na fase aguda da doença de chagas em modelo murinho de treinamento físico: relação do óxido nítrico e citocinas inflamatórias com parâmetros cardiovasculares", registrado sob o processo CEUA nº28105.2014.72, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 80 camundongos Swiss machos, com 21 dias de idade e provenientes do Biotério Central da UEL. O projeto tem como objetivo avaliar os efeitos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca e a relação com os níveis de NO e citocinas em camundongos infectados por *T. cruzi* e submetidos ou não previamente a um protocolo de treinamento físico. Para tanto, os animais serão submetidos a um programa de atividade física aeróbica em esteira motorizada por um período de 8 semanas ou mantidos sedentários e serão inoculados por via intraperitoneal com  $5 \times 10^3$  formas de tripomastigotas da cepa Y e *T. cruzi* ou PBS (controle), será realizada parasitemia através de 5µL de sangue venoso heparinizado obtido da cauda do camundongo, a medida dos parâmetros cardiovasculares serão realizadas antes e depois da infecção por meio do método de registro de volume de pressão, após a inoculação, os grupos experimentais e controles serão anestesiados, será realizada punção cardíaca e os animais terão seus corações removidos após eutanásia. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 12 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

*Waldiceu Ap. Viegas Junior*

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Viegas Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Prof. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge**

Coordenadora do Projeto  
Departamento de Ciências Fisiológicas  
Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Luiz Carlos Juliani (Diretor da Biotério Central da UEL) e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

Campus Universitário - Bairro Cx. Caixa Postal 451, Set. 06 - Fone: (51) 3333-2185 - Fax: 3333-2208 - Caixa Postal 30911 - CEP: 86051-970 - Internet: <http://www.uel.br>  
LONDRIÑA - PARANÁ - BRASIL