

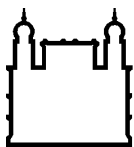
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

Alterações neurológicas e comportamentais
(ansiedade, depressão e memória) na fase
crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*:
modelo experimental e propostas terapêuticas

GLAUCIA VILAR PEREIRA

Rio de Janeiro
Outubro/2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

GLAUCIA VILAR PEREIRA

Alterações neurológicas e comportamentais (ansiedade, depressão e memória)
na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: modelo experimental e
propostas terapêuticas

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Joseli Lannes-Vieira

RIO DE JANEIRO

Outubro/2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P436 Pereira, Glaucia Vilar

Alterações neurológicas e comportamentais (ansiedade, depressão e memória) na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: modelo experimental e propostas terapêuticas / Glaucia Vilar Pereira. – Rio de Janeiro, 2016.

xix, 219 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 147-196

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Alterações comportamentais. 4. Intervenções terapêuticas. I. Título.

CDD 616.9363

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: GLAUCIA VILAR PEREIRA

Alterações neurológicas e comportamentais (ansiedade, depressão e memória) na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: modelo experimental e propostas terapêuticas

ORIENTADORA: Dra. Joseli Lannes-Vieira

Aprovada em: 27/outubro/2016

EXAMINADORES:

- Dr. Leonardo José Moura de Carvalho (IOC/Fiocruz) – Presidente**
- Dra. Paula Campello Costa Lopes –(UFF/RJ) – Membro titular**
- Dra. Mariana Caldas Waghbi (IOC/Fiocruz) – Membro titular**
- Dra. Andrea Alice da Silva (UFF/RJ) – Suplente**
- Dr. Rafael Mariante Meyer (IOC/Fiocruz) – Suplente**

Rio de Janeiro, 27 de outubro de 2016

Dedicatória

Aos meus pais

*“Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas
outra alma humana.”*

Carl Jung

Agradecimentos

Aos meus pais, por todo esforço, ajuda, compreensão e amor, e por sempre me ajudar com as palavras necessárias em cada momento;

À minha família pelo carinho, amor, por estar sempre do meu lado, me apoiando e me ajudando com palavras de força e estímulo;

À minha orientadora, Dra. Joseli Lannes-Vieira, por me abrir as portas ao mundo da ciência. Agradeço pela orientação e por me dar o suporte necessário para o bom andamento dos trabalhos;

À Dra Andrea Alice da Silva, pela enorme disposição em me ajudar na resolução dos problemas. Agradeço também pela compreensão e dedicação para comigo neste trabalho;

A todos do Laboratório de Biologia das Interações, um local onde eu tenho companheiros de trabalho e amigos!

Um obrigado especial também aos professores Mariana Waghbi (IOC/Fiocruz), Otacílio Moreira (IOC/Fiocruz), Cláudia Paiva (UFRJ), Hilton Antonio (UFRJ), Alexandre Pyrrho (UFRJ), Luzineide Tinoco (UFRJ) pelo apoio, colaboração, por terem me oferecido uma enorme ajuda num momento crucial de minha caminhada;

Aos amigos da secretaria/apoio laboratorial, por sempre nos ajudarem e tornarem essa caminhada menos pesada. Obrigado Viviane, Marco Antônio, Flávio, Lucilene e João Júnior;

Obrigado aos demais amigos e colaboradores dos laboratórios vizinhos Roberto (IOC/Fiocruz), Nathalia (IOC/Fiocruz), Raquel (UFRJ), sempre receptivos e dispostos a ajudar;

Ao pessoal do Biotério do Pavilhão Cardoso Fontes, pela disposição e ajuda a mim dispensadas, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos animais que foram utilizados nesse estudo, meus sinceros agradecimentos e reconhecimento pela importância que têm;

À Fiocruz e ao IOC, pelo ensino de qualidade;

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra foram essenciais em meu caminho. Muito obrigado!

Resumo

A doença de Chagas (DC) é causada pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e consiste num importante problema de saúde pública nas Américas do Sul e Central. O acometimento do sistema nervoso central (SNC) na DC foi demonstrado na fase aguda em crianças e na reativação da infecção em pacientes crônicos imunossuprimidos. Na maioria dos pacientes, as manifestações clínicas de fase aguda, incluindo alterações neurológicas, desaparecem de forma espontânea, sem sequelas aparentes na fase crônica da infecção. Contudo, portadores da DC crônica apresentam alterações comportamentais de psicomotricidade, percepção ambiental e visual, distúrbios de atenção e do sono, déficit mnemônico e depressão. Neste trabalho, trazemos evidências que camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* reproduzem aspectos de alterações comportamentais descritas nos portadores crônicos da DC. Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* (150 dias após a infecção, dpi) apresentam (i) ansiedade (ao teste de labirinto em cruz elevado), (ii) alterações da coordenação motora (ao teste *rotarod*), (iii) comportamento depressivo (ao teste de suspensão da cauda e nado forçado) e (iv) déficit cognitivo (aos testes de reconhecimento de objeto e de habituação ao ambiente, mas não ao teste de esquiva passiva). Com o objetivo de compreender a fisiopatologia das alterações comportamentais em DC crônica abordamos a participação (i) da recaptção de serotonina, usando fluoxetina (Fx), (ii) do parasito, usando a droga tripanossomicida benznidazol (Bz), (iii) da resposta imune, usando o imunorregulador pentoxifilina (PTX), e (iv) a associação de Bz com PTX (Bz+PTX). Também, estudamos a correlação entre alterações comportamentais e alterações neuroquímicas no córtex cerebral e hipocampo no curso da infecção pelo *T. cruzi*, estudando a produção dos neurotransmissores GABA e glutamato e a expressão do fator neurotrófico do cérebro (BDNF). Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados (120 dpi) foram tratados durante 30 dias consecutivos com Bz, PTX, Bz+PTX ou Fx. Estas terapias reverteram ou melhoraram as alterações aos testes comportamentais de depressão, ansiedade e déficit cognitivo. A melhora das alterações comportamentais ocorreu em paralelo à redução do estresse oxidativo (avaliado pelos níveis de malondialdeído, usando TBARS) e a efeitos benéficos na expressão dos neurotransmissores GABA e glutamato (dosados por ressonância nuclear magnética) e do fator neurotrófico BDNF no SNC (em estudo de expressão gênica por qRT-PCR). Assim, nossos dados sustentam que as alterações comportamentais na DC não estão restritas a fatores psicológicos, mas podem residir em uma rede complexa de interações desencadeadas pelo parasito *T. cruzi*, levando a alterações neuroimunes, que podem ser reduzidas por terapias alvo-específicas.

Abstract

Chagas disease (CD) is caused by *Trypanosoma cruzi* infection and is a major public health problem in South and Central America. The involvement of the central nervous system (CNS) in CD was demonstrated in the acute phase in children and reactivation of infection in immunocompromised chronic patients. In most patients, the clinical manifestations of the acute phase, including neurological disorders disappear spontaneously without apparent sequelae in the chronic phase of infection. However, chronic CD patients have behavioral changes as psychomotor, environmental and visual perception, attention and sleep disorders, mnemonic deficit and depression. In this work, we bring a set of evidence that mice chronically infected with *T. cruzi* reproduce aspects of behavioral changes described in chronically infected DC patients. C57BL/6 mice chronically infected with the Colombian strain of *T. cruzi* (150 days post infection, dpi) show behavioral changes such as (i) anxiety (elevated maze test in cross), (ii) motor coordination alteration (rotarod test), (iii) depressive behavior (tail suspension and forced swim tests) and (iv) cognitive deficit (the object recognition and habituation tests but not to the). In passive avoidance test) In order to shed light on the pathophysiological mechanisms of behavioral changes in chronic CD, we analyzed the participation of (i) the serotonin reuptake, using fluoxetine (Fx), (ii) the parasite, using the trypanocidal drug benznidazole (Bz), (iii) the immune response, using the immunoregulator pentoxifylline (PTX) and (iv) the association of Bz with PTX (Bz+PTX). Also, we studied the correlation between behavioral alterations and neurochemical changes in brain cortex and hippocampus during *T. cruzi* infection, studying the production of the neurotransmitters GABA and glutamate, using magnetic nuclear resonance, and the expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), using qRT-PCR. C57BL/6 mice chronically infected (120 dpi) were treated for 30 consecutive days with Bz, PTX, Bz+PTX or Fx. These therapies reversed or improved alterations detected by behavioral tests of depression, anxiety and cognitive impairment. The improvement in behavioral changes occurred in parallel to the reduction of oxidative stress (malondialdehyde levels estimated by using the TBARS) and beneficial effects on the expression of neurotransmitters GABA and glutamate and neurotrophin BDNF in the CNS. Thus, we support the behavioral changes in CD are not limited to psychological factors, but may reside in a complex network of interactions triggered by the *T. cruzi* parasite, leading to neuroimmune alterations, which can be reduced by target-specific therapies.

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i> (síndrome da imunodeficiência adquirida)
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil;5-4-isoxazolproptonico
ART	Arritmia
AVC	Acidente vascular cerebral
AVEi	Acidente vascular cerebral de origem embólica
BAV2	Bloqueio átrio-ventricular de segundo grau
BDNF	Brain-derived neurotrophic fator (fator neurotrófico derivado do cérebro)
BZ	Benznidazol
CAM	Moléculas de adesão celular
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DC	Doença de Chagas
dpi	Dias após a infecção
ECG	Eletrocardiograma
EO	Estresse oxidativo
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FST	Teste do nado forçado
F _x	Fluoxetina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (proteína ácida fibrilar glial)
GPMT	<i>Grip strength meter</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HPA	Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal
IC	Insuficiência cardíaca
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenase
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
KA	Ácido quimurênico
LCE	Labirinto em cruz elevado
MDA	Malondialdeído
NI	Não infectado
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PTX	Pentoxifilina
QA	Ácido quinolínico
RNM	Ressonância nuclear magnética
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RRT	Rotarodo

SNC	Sistema nervoso central
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TRIP	Triptofano
TST	Teste de suspensão de cauda
YLDD	<i>Years Livid Whit Disability</i>

Lista de Figuras

Figura 1.1:	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 1.2:	Curso natural da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
Figura 1.3	Mecanismos de ações cerebrais de citocinas	39
Figura 7.1	Curva de parasitemia, mortalidade e ausência de comportamento associado à doença (<i>sckiness behavior</i>) durante a infecção experimental de camundongos C57BL/6 pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
Figura 7.2	A infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> induz alterações eletrocardiográficas (ECG) durante a fase crônica da infecção (150 dpi)	76
Figura 7.3	Infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> induz comportamento depressivo em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi).	78
Figura 7.4	Comportamento compulsivo inato em camundongos C57BL/6 durante a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	80
Figura 7.5	Comportamento de ansiedade e alteração locomotora / exploratória em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi) pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	82
Figura 7.6	Transtorno de coordenação motora, força muscular inalterada e ausência de <i>sickness behavior</i> na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi)	84
Figura 7.7.1	Ausência de déficit na memória aversiva observada em camundongos C57BL/6 durante a fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	86
Figura 7.7.2	Infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> induz déficit mnemonico em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi)	88
Figura 7.7.3	Infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> induz déficit mnemonico da memória de reconhecimento em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção	90
Figura 7.8.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> induz alterações eletrocardiográficas (ECG) durante a fase crônica da infecção (150 dpi)	92

Figura 7.8.2	Comportamento depressivo induzido pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> é revertido e comportamento de ansiedade melhora com a intervenção terapêutica com Fluoxetina (Fx) em camundongos C57BL/6 na fase crônica (150 dpi)	94
Figura 7.8.3	Comportamento compulsivo inato e de ansiedade em camundongos C57BL/6 durante a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	96
Figura 7.8.4	Intervenção terapêutica com Fx melhora déficit mnemônico em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi)	98
Figura 7.9.1	Intervenções terapêuticas reduzem a carga parasitária nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	100
Figura 7.9.2	Terapias tripanossomicida, imunorreguladora ou combinada restauram ou melhoram alterações eletrocardiográficas (ECG) durante a fase crônica da infecção (150 dpi)	103
Figura 7.9.3	Intervenções terapêuticas revertem comportamento depressivo induzido pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> e melhora comportamento de ansiedade em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção	105
Figura 7.9.4	Intervenções terapêuticas recuperam comportamento compulsivo inato e melhoram comportamento de ansiedade em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	107
Figura 7.9.5	Intervenções terapêuticas melhoram déficit mnemônico no teste de habituação em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi)	109
Figura 7.9.6	Intervenções terapêuticas específicas reduzem estresse oxidativo detectado por reação com TBARS em córtex e hipocampo de camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi)	111
Figura 7.9.7	Intervenções terapêuticas reduzem concentrações de glutamato e GABA no córtex cerebral de camundongos	113

C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi)

Figura 7.9.8 Intervenções terapêuticas reduzem concentrações de 116
glutamato no hipocampo de camundongos C57BL/6
cronicamente infectados (150 dpi)

Figura 7.9.9 Intervenções terapêuticas aumentam a expressão gênica do 119
BDNF no córtex de camundongos C57BL/6 cronicamente
infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (150 dpi)

Sumário

Abstract	
Lista de Abreviaturas	
Lista de Figuras	
1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu ciclo biológico	19
2.2 A doença de Chagas	21
2.3 Sistema nervoso central e a doença de Chagas	25
2.3.1 O sistema nervoso central	25
2.3.2 Comprometimento do sistema nervoso central na doença de Chagas	25
2.3.3 O sistema nervoso central na reativação da doença de Chagas	29
2.3.4 Células do sistema nervoso central susceptível à infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
2.3.5 Alterações neurológicas na vigência de alterações eletrocardiográficas da doença de Chagas	33
2.3.6 O estresse oxidativo na doença de Chagas	35
2.4 Alterações comportamentais na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
2.4.1 Alterações comportamentais	37
2.4.2 Ansiedade	40
2.4.3 Depressão	43
2.4.4 Memória	51
3. Justificativa e Hipótese	54
4. Objetivos	56
4.1 Objetivo geral	56
4.2 Objetivos específicos	56
5. Material e Métodos	57
5.1 Animais, parasitos e infecção experimental pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
5.2 Avaliação eletrocardiográfica	58
5.3 Avaliação comportamental	59
5.3.1 Avaliação de depressão	59
5.3.2 Comportamento compulsivo inato	61

5.3.3	Ansiedade	62
5.3.4	Memória	63
5.3.5	Locomoção / exploração	66
5.3.6	Coordenação motora	67
5.3.7	Força muscular	68
5.4	Intervenções terapêuticas	69
5.5	Quantificação de carga parasitária no SNC por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	69
5.6	Análise da expressão gênica do fator neurotrófico BDNF por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	70
5.7	Determinação dos neurotransmissores glutamato e GABA no SNC por ressonância nuclear magnética (RNM)	71
5.8	Análise de estresse oxidativo no SNC pelo método de TBARS	71
6.	Análise Estatística	72
7.	Resultados	73
7.1	Parasitemia, mortalidade e inexistência de <i>sickness behavior</i> nos animais durante a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
7.2	Alterações elétricas em camundongos da linhagem C57BL/6 cronicamente infectados pela cepa Colombiana do <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
7.3	Comportamentos semelhantes à depressão estão presentes em camundongos C57BL/6 na infecção experimental crônica pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
7.4	Ausência de comportamento compulsivo inato em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	79
7.5	Comportamento de ansiedade e alteração locomotora/exploratória está presentes em camundongos C57BL/6 durante a fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	81
7.6	Transtornos na coordenação motora, força muscular inalterada e ausência de <i>sickness behavior</i> em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
7.7	Avaliação da memória em camundongos da linhagem C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	85
7.7.1	Ausência de déficit mnemônico no teste de memória aversiva em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	85
7.7.2	Infecção crônica pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> induz déficit mnemônico no teste de memória de habituação em camundongos C57BL/6	87

7.7.3 Déficit mnemônico no teste de reconhecimento de objetos em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	89
7.8 Intervenção com o antidepressivo Fluoxetina em camundongos C57BL/6 na infecção crônica pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
7.8.1 Tratamento com Fluoxetina melhora anormalidades no eletrocardiograma em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
7.8.2 Intervenção terapêutica com Fluoxetina reverte o comportamento depressivo e melhora o comportamento de ansiedade nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção	93
7.8.3 Comportamento compulsivo inato é restaurado e alteração locomotora / exploratória é melhorada pela intervenção terapêutica com Fluoxetina em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	95
7.8.4 Intervenção terapêutica com Fluoxetina propicia efeito benéfico na memória de habituação e de reconhecimento de objetos nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	97
7.9 Intervenções terapêutica com as drogas tripanossomicida Benznidazol, medicamento imunorregulador Pentoxifilina e a combinação de ambas as terapias	99
7.9.1 Intervenções terapêuticas reduzem a carga parasitária nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	99
7.9.2 Terapia combinada restaura intervalos normais de QTc no ECG dos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	101
7.9.3 Intervenção terapêutica reverte comportamento depressivo e favorece melhora no comportamento de ansiedade em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	104
7.9.4 Esquema terapêutico recupera o comportamento compulsivo inato e reduz alterações locomotoras / exploratórias em camundongos C57BL/6, na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	106
7.9.5 Intervenções terapêuticas foram benéficas no déficit mnemônico em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	108
7.9.6 Estresse oxidativo presente em animais cronicamente infectados pelo <i>T. cruzi</i> é reduzido pelas terapias propostas	110

7.9.7 Intervenções terapêuticas com PTX, Bz+PTX e Fx diminuem a concentração dos neurotransmissores glutamato e GABA no córtex cerebral dos camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	112
7.9.8 Intervenções terapêuticas diminuem a concentração do neurotransmissor glutamato no hipocampo dos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	115
7.9.9 Intervenções terapêuticas aumentam a expressão gênica de BDNF no córtex cerebral dos camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	118
8. Discussão	120
9. Conclusões	144
10. Limitações e Perspectivas	146
11. Referências Bibliográficas	147
12. Anexos	197

1. Introdução

A existência da forma nervosa da doença de Chagas (DC) é uma questão de discussão desde a descrição de distúrbios neurológicos, de aprendizagem e de comportamento por Carlos Chagas (Chagas, 1911; Silva et al. 2010). Mais de cem anos após a descoberta da DC, pouco se sabe sobre a fisiopatologia das alterações de comportamento dos portadores desta enfermidade. Na maioria dos pacientes, as manifestações clínicas de fase aguda, incluindo alterações neurológicas, desaparecem de forma espontânea, sem sequelas aparentes na fase crônica da infecção (Prata, 2001; Pittella, 2009). Estudos com diferentes coortes têm indicado que pacientes, portadores crônicos da DC, apresentam alterações comportamentais, como depressão e distúrbios de memória (Wackermann et al. 2008; Lima-Costa et al. 2009; Ozaki & Guariento, 2011; Guimarães et al. 2014). Para muitas pessoas portadoras da DC ainda persiste o desafio de como conviver com uma enfermidade para qual não há cura. Diante das incertezas sociais e das privações reais, o diagnóstico de soropositividade para DC pode ter um forte impacto mental ao ponto de levar a uma séria deterioração do estado emocional, social e físico do portador (Osaki et al. 2011; Guimarães et al. 2014).

Visando ao entendimento da fisiopatogenia das alterações comportamentais da DC, reproduzimos no nosso laboratório em modelo de infecção experimental, aspectos importantes da DC. Mostramos que camundongos C3H/He adultos jovens infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* apresentam meningoencefalite restrita à fase aguda da infecção, que se auto resolve, enquanto animais C57BL/6 são resistentes à meningoencefalite (Roffê et al. 2003). Contudo, animais das linhagens C3H/He e C57BL/6 apresentam depressão na fase crônica da infecção, indicando que esta alteração comportamental independe da existência prévia da meningoencefalite aguda, não sendo, portanto, uma sequela desta (Vilar-Pereira et al. 2012). Estes dados nos levaram a questionar, adotando modelos de infecção experimental pelo *T. cruzi*, a existência de alterações neurológicas e comportamentais durante a fase crônica da infecção. Embora o acometimento do sistema nervoso central (SNC) durante esta fase da DC permaneça não esclarecido, o SNC é o principal sítio de infecção em episódios de reativação crônica, os quais frequentemente são acompanhados por grave

forma de meningoencefalite que ocorre em cerca de 87% dos casos; além de miocardite, que ocorre em cerca de 30% dos casos (Antunes et al. 2002), apresentando graves lesões (Rocha et al. 1994). Já foi demonstrado anteriormente que as células gliais, especialmente astrócitos e micróglia, são os principais tipos celulares parasitados no SNC (Villela, 1932; Pittella, 1991). As alterações comportamentais podem ser consequências de presença do parasito no SNC. Desta forma, nosso projeto tem como hipótese que as alterações neurológicas e comportamentais (ansiedade, depressão e distúrbios de memória) estão presentes na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* associadas à uma rede complexa de interações provocadas pelo parasito. Posteriormente, baseado em nossos achados, mostramos que camundongos C57BL/6 cronicamente infectados (150 dias após a infecção, dpi) apresentaram além do comportamento depressivo, alterações comportamentais de ansiedade e falta de coordenação motora. Estas alterações não estavam associadas a doenças neuromusculares nem ao comportamento associado à doença (*sickness behavior*) (Vilar-Pereira et al. 2015). A partir destes achados, buscamos entender, nos modelos experimentais que reproduzem aspectos das mudanças de comportamento (depressão e ansiedade), detectadas em pacientes de DC, fatores fisiopatogênicos que levam a essas alterações comportamentais. Mostramos recentemente que o modelo de infecção crônica de camundongos C57BL/6 com a cepa Colombiana do *T. cruzi* é adequado para explorar mecanismos fisiopatogênicos da forma nervosa da DC e para ferramentas terapêuticas, que também poderiam ser aplicáveis a distúrbios não infecciosos (Vilar-Pereira et al. 2012; Vilar-Pereira et al. 2015). A seguir revemos os dados da literatura que nos levaram a propor esta hipótese.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 O *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo biológico

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado da família *Trypanosomatidae* (De Souza, 2002). É o agente etiológico da Tripanossomíase Americana ou DC, uma antropozoonose frequente na América Latina. A Tripanossomíase Americana foi descoberta por Carlos Chagas em 1909, quem descreveu também seu agente etiológico, vetor, reservatórios naturais e o ciclo do *T. cruzi*, bem como os sinais principais da doença causada por esse parasito em humanos (Chagas, 1909).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo biológico complexo (Figura 1.1), que, sob condições naturais, se alterna entre hospedeiros invertebrados, uma grande diversidade de hemípteros hematófagos (mais de 130 hemípteros da família *Reduviidae*) popularmente conhecidos como “barbeiro” ou “chupão”, e hospedeiros vertebrados (mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens) (Lambrecht, 1965; Zeledón & Rabinovich, 1981). Parte do ciclo vital desse protozoário ocorre no triatomíneo e a outra parte no hospedeiro vertebrado infectado, envolvendo formas proliferativas e formas com capacidade infectante (Chagas, 1909).

Ao realizar repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o vetor triatomíneo torna-se infectado ao ingerir as formas tripomastigotas sanguíneas. Nos triatomíneos, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas (formas replicativas no hospedeiro invertebrado) no intestino médio, onde se multiplicam por divisão binária simples. A diferenciação em tripomastigotas metacíclicas altamente infectantes ocorre na porção final do trato digestivo do inseto, sendo esta forma eliminada junto às fezes após o repasto do vetor. No momento do repasto, formas tripomastigotas metacíclicas infectivas penetram pelas camadas iniciais da derme ou das mucosas, podendo entrar na circulação sanguínea. Do sangue os parasitos infectam tecidos e invadem praticamente todos os tipos celulares. Uma vez formado e rompido o vacúolo parasitóforo no interior das células infectadas, os tripomastigotas se posicionam no citoplasma da célula hospedeira, onde se diferenciam em formas amastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária simples. Após aproximadamente nove ciclos de divisão, as formas amastigotas voltam a se diferenciar em formas tripomastigotas, as quais rompem a célula hospedeira e alcançam a circulação sanguínea, de onde podem reinfectar

outras células, ou serem ingeridas por um vetor na ocasião de um novo repasto sanguíneo (De Souza et al. 2010; Rassi Jr et al. 2012).

Diversas células do organismo, incluindo macrófagos, células da glia, células endoteliais, fibras musculares lisas, esquelética e cardíaca podem ser infectadas pelo *T. cruzi* (Tanowitz et al. 2009).

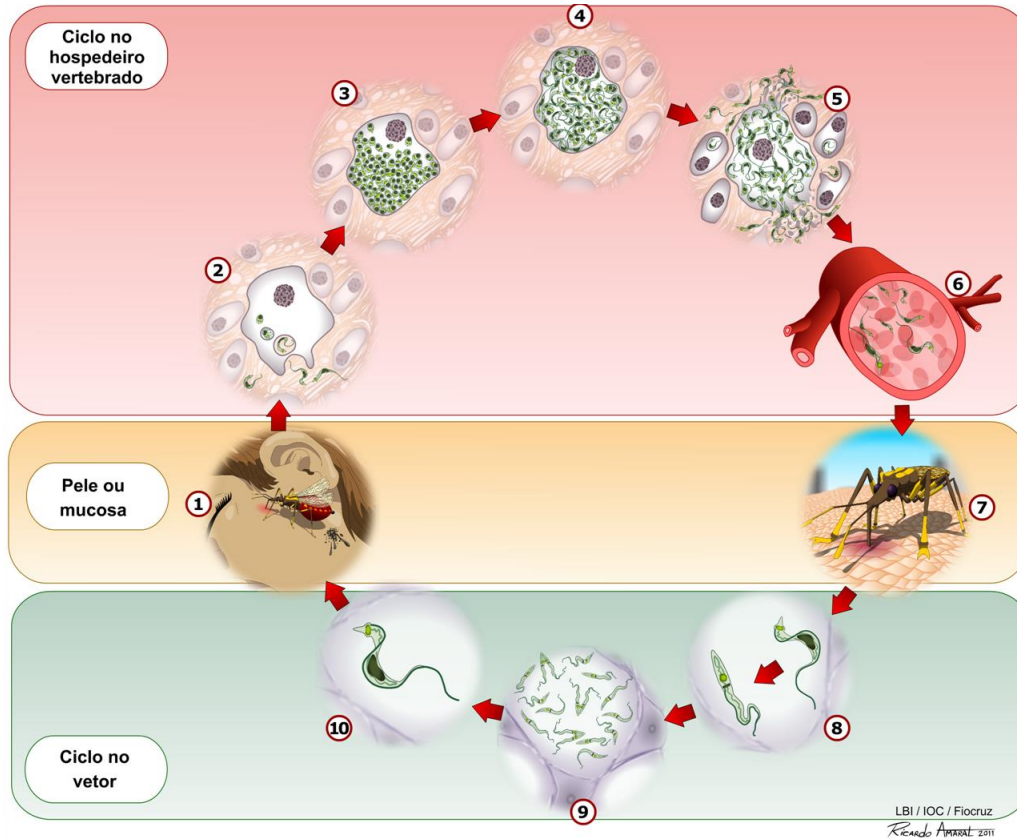


Figura 1.1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. O ciclo biológico do *T. cruzi*. O *T. cruzi* é naturalmente transmitido pelo inseto hemíptero (barbeiro) da família *Reduviidae*. Durante o repasto sanguíneo, o inseto deposita na pele do hospedeiro vertebrado as fezes contendo a forma infectante do parasito (1). Em seguida, a forma tripomastigota metacíclica alcança o tecido subjacente e a corrente sanguínea do hospedeiro através da picada do inseto, pelo espalhamento até áreas lesionadas ou pelas mucosas. Nos hospedeiros mamíferos, formas tripomastigotas penetram em células locais (2) e se diferenciam em amastigotas; que são formas intracelulares e reprodutivas do parasito (3). Ocorre uma nova diferenciação para forma infectante tripomastigota (4) causando o rompimento da célula e liberação dos parasitos na circulação (5). Estes podem invadir novas células, ficar no sangue (6) ou colonizar outros tecidos. Os hemípteros são infectados quando ingerem formas tripomastigotas durante o seu repasto sanguíneo (7). No hospedeiro invertebrado, as formas tripomastigotas ingeridas evoluem para as formas epimastigotas (8), as quais se multiplicam intensamente ao longo do tubo digestivo do inseto (9) e ao atingirem a ampola retal diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas (10), que são formas infectantes para o hospedeiro mamífero. Criação coletiva do Laboratório de Biologia das Interações (baseado em Chagas, 1909).

2.2 A doença de Chagas

A DC é endêmica da América Latina e é considerada um dos principais problemas de saúde pública nesta região, onde afeta entre 8 a 15 milhões de pessoas. Aproximadamente 100 milhões de pessoas se encontram sob risco de infecção (Lannes-Vieira et al. 2010; Rassi Jr et al. 2010; Rassi Jr et al. 2012). Entretanto, o fluxo de imigrantes dos países endêmicos fez com que essa doença se tornasse um problema de saúde fora dos limites da América Latina, passando a afetar países como EUA e Canadá, assim como países da Europa, Ásia e Oceania (Rassi Jr et al. 2010; Rassi Jr et al. 2012; Hotez et al. 2013; Strasen et al. 2014). O I Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (MS, 2005) indicou que havia aproximadamente dois milhões de portadores crônicos de DC no Brasil, contudo a revisão recente destes números indica 4,9 milhões de infectados (IC 95%: 2-9 a 7,2 milhões) pelo *T. cruzi* no Brasil (II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, MS, 2015). O controle do principal vetor da DC, o *Triatoma infestans*, resultou em redução de mais de 95% do número de casos de infecção aguda, modificando o quadro da DC no Brasil, da maioria dos pacientes entre 20-50 anos de idade na década de 1950 para a maioria dos portadores acima de 40 anos de idade atualmente (Laranja et al. 1956; Rassi Jr et al. 2010). Cerca de 10 a 30 anos após a infecção, 30 a 40% dos portadores da DC evoluem para a forma cardíaca da DC. A transmissão oral a partir de formas tripomastigotas ocorre pela ingestão de alimentos contaminados com protozoários provenientes de excretas de triatomíneos, tem sido observada com frequência e é responsável por surtos em diversos locais (Coura, 2007; Ferreira et al. 2014).

Classicamente, humanos e outros mamíferos se tornam infectados pelo agente causador no local da picada do inseto vetor ou após carreamento de dejetos do inseto contendo formas infectivas para as mucosas. Outras formas de infecção se dão por via oral, através da ingestão de alimentos contendo as formas tripomastigotas do parasito, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes de laboratório e transmissão materno-fetal (Villalta et al. 2013).

A DC caracteriza-se por apresentar duas fases clínicas: a fase aguda e a fase crônica (Figura 1.2). A fase aguda ocorre logo após a infecção, sendo caracterizada pela presença de parasitos circulantes no sangue periférico

(parasitemia patente), bem como pelos sinais de porta de entrada do parasito, como o chagoma de inoculação (na pele) e/ou edema unilateral ou bipalpebral (sinal de Romaña). Nesta fase, nos tecidos alvos da infecção encontram-se intensos infiltrados inflamatórios. Na fase aguda, em grande parte dos indivíduos a doença é assintomática ou a sintomatologia pode passar despercebida, porém parte dos pacientes pode apresentar febre, mal-estar, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, inflamação no tecido cardíaco (miocardite) com alterações elétricas transitórias, e/ou no sistema nervoso central (meningoencefalite). A inflamação tecidual tende a diminuir após a fase aguda da infecção (Rassi Jr et al. 2010; Tanowitz et al. 2009; Rassi Jr et al. 2012).

Embora incomum, a morte pode ocorrer na fase aguda da DC (5-10% dos casos sintomáticos), especialmente nos casos de miocardite grave ou meningoencefalite, ou ambas (Prata, 2001; Rassi Jr et al. 2010). Além disso, a infecção em crianças abaixo de 2 anos de idade ou em indivíduos imunossuprimidos, geralmente, leva a quadros graves de meningoencefalite, na maioria das vezes fatais (Sanches et al. 2014; Córdova et al. 2010; Coura, 2007).

As manifestações da fase aguda se resolvem espontaneamente em pelo menos 90% dos indivíduos (Rassi Jr et al. 2010; Tanowitz et al. 2009). A presença do parasito induz uma acentuada resposta imunológica no indivíduo, e conseqüente diminuição a níveis sub-patentes de parasitos no sangue ou nos tecidos, sendo antígenos e DNA do parasito detectados no tecido cardíaco por técnicas de imunistoquímica ou biologia molecular, respectivamente (Reis et al. 1993; Jones et al. 1993) e, após um período que vai de dois a quatro meses, esses indivíduos progridem à fase crônica da DC (Prata, 2001; Dutra et al. 2005; Rassi Jr et al. 2012). A fase crônica apresenta as seguintes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardio/digestiva ou mista (Rassi Jr et al. 2010), sendo a existência da forma nervosa ainda matéria de debate (Prata et al. 2001; Wackermann, 2008; Silva et al. 2010; Ozaki et al. 2011; Guimarães et al. 2014).

A forma indeterminada é a mais frequente e caracterizada por ausência de sinais clínicos ou sintomas. Apesar de apresentarem positividade para anticorpos anti-*T. cruzi*, os portadores da infecção chagásica não apresentam alterações nos exames eletrocardiográficos (ECG) e radiografias mostram

coração, esôfago e cólon com aspecto normal. Dos pacientes que evoluem para as formas sintomáticas da DC, a maioria apresenta a forma cardíaca (Prata, 2001; Coura, 2007; Rassi Jr. et al. 2010; Rassi Jr et al. 2012). Cerca de 30-40% dos pacientes desenvolvem a forma cardíaca, caracterizada pela presença de infiltrados inflamatórios, lesão nas fibras cardíacas e consequente remodelamento do tecido e fibrose, que levam à disfunção cardíaca crônica (Rassi Jr et al. 2010, Álvarez et al. 2014). Com o progresso da lesão tecidual ocorrem alterações cardíacas como a perda do tônus muscular, arritmias, dilatação do coração, aneurisma apical, diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e insuficiência cardíaca (IC), além de anormalidades na condução átrio-ventricular e intraventricular provocadas por destruição dos tecidos de condução, dentre outras manifestações (Laranja et al. 1953, Higuchi et al. 2003, Rassi Jr et al. 2010).

Uma percentagem menor dos pacientes, cerca de 10-15%, apresenta a forma digestiva (Prata, 2001; Rassi Jr et al. 2012). Esta forma é caracterizada por alterações na secreção, na motilidade, na absorção e, nos casos mais graves, devido à intensa destruição dos plexos mioentéricos, provocada tanto pelo parasito quanto pela resposta imune inflamatória do hospedeiro, ocorre disperistalsia do esôfago e cólon, levando à síndrome dos megas (megaesôfago e megacólon) (Coura, 2007; Rassi Jr et al. 2012). Como resultado do megaesôfago, o indivíduo apresenta disfagia, dor epigástrica, regurgitação, ptialismo, além de má nutrição. O megacólon causa prolongada constipação intestinal, distensão abdominal e, ocasionalmente, obstrução intestinal devido ao fecaloma (acúmulo de fezes no cólon sigmóide) (Rassi Jr et al. 2010; Rassi Jr et al. 2012). Há ainda um reduzido grupo de pacientes sintomáticos com a forma cardio-digestiva, ou seja, que apresenta concomitantemente as complicações cardíacas e digestivas abordadas acima.

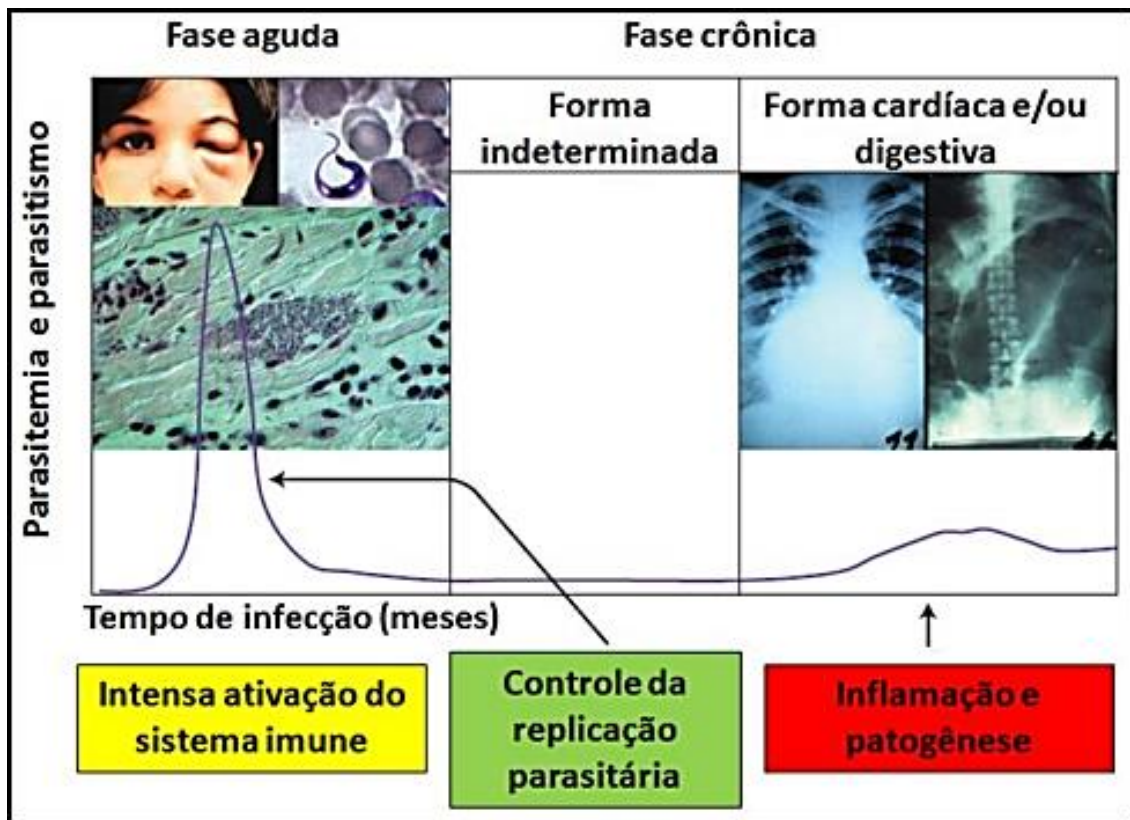


Figura 1.2: Curso natural da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Após infecção com o parasito, o paciente apresenta alta parasitemia e parasitismo, caracterizando a fase aguda da doença, com duração de dois a quatro meses. Devido à intensa ativação do sistema imune, há controle da replicação do parasito, de forma que há diminuição dos níveis de parasitemia e parasitismo, dando início à fase crônica. A fase crônica apresenta quatro formas clínicas distintas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Estima-se que 70% dos infectados chagásicos apresentem a forma indeterminada da doença e, embora o prognóstico desses pacientes seja favorável, sabe-se que 2 a 5% desses pacientes podem evoluir, anualmente, para as formas sintomáticas da doença, sejam essas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva com distintas manifestações patológicas que refletem o grau de morbidade associado à infecção (Modificado a partir de Junqueira et al. 2010).

A partir da década de 1980, com a criação e melhoria dos programas de controle vetorial e triagem obrigatória dos bancos de sangue, começou a haver redução substancial no número de novos casos de infecção (Prata, 2001; Lannes-Vieira et al. 2010; Rassi Jr et al. 2010). No Brasil, a incidência de novos casos passou de aproximadamente 100 mil em 1980 para menos de 500 casos agudos por ano entre 2001 e 2006 (Lannes-Vieira et al. 2010). Nos últimos anos a participação do parasito como protagonista na patogenia das lesões teciduais diretamente ou participando do desencadeamento de resposta imune desregulada, possivelmente envolvida na formação das lesões teciduais, fez ressurgir o interesse no entendimento dos mecanismos patogênicos, desenvolvimento de vacinas, assim como de terapias associativas, visando ao

melhor prognóstico dos pacientes, particularmente dos portadores da forma cardíaca da DC (Lannes-Vieira et al. 2010; Vilar-Pereira et al. 2012; da Cunha Filho et al. 2013; Pereira et al. 2015 a ; Vilar-Pereira et al. 2016).

2.3 Sistema nervoso central e a doença de Chagas

2.3.1 O Sistema nervoso central

O SNC controla as funções orgânicas e a integração ao meio ambiente. Ou seja, ele não somente controla e coordena as funções de todos os sistemas do organismo, mas também, ao receber os devidos estímulos, é capaz de interpretá-los e desencadear respostas adequadas a eles. Todas as sensações são controladas pelo SNC (Grabowski, 2008). O SNC é o local onde acontecem os pensamentos, as emoções e as memórias (Kandel et al. 2003; Lent, 2004; Gerbasi & Costa, 2015). A homeostase é mantida pelas suas atividades reguladoras e coordenadoras, concretamente pelas capacidades de detectar, interpretar e responder a mudanças (Izquierdo, 2011; Zeltzer et al. 2012). Portanto, o SNC é uma rede de células nervosas que integra, de uma forma estruturada, dinâmica, interdependente e interativa, as atividades dos seus diversos componentes e se constitui como o principal responsável pela regulação das funções do nosso organismo, suas respostas e reações aos estímulos ou situações proporcionados ou desencadeados pelo meio exterior (Horvath, 2006).

2.3.2. Comprometimento do sistema nervoso central na doença de Chagas

Carlos Chagas foi o primeiro pesquisador a descrever lesões neuropatológicas relacionadas à DC caracterizadas pela presença do parasito no SNC de humanos (Chagas, 1909, 1911, 1916). Perturbações funcionais como retardamento da evolução em crianças com condições intelectuais precárias, ocorrência de convulsões muito frequentes em diversas idades e infantilismo em adultos foram observadas por Chagas (1909). A caracterização da forma nervosa por Carlos Chagas foi justificada por autópsia em uma criança que veio a óbito por meningoencefalite. As lesões foram denominadas “focos múltiplos disseminados” em diversas regiões do SNC, atribuindo a essa multiplicidade de localizações a expressão das variantes clínicas da síndrome nervosa. “Graus variados de comprometimento da inteligência e da linguagem”,

convulsões além de perturbações motoras foram observadas em portadores da doença de Chagas. Focos parasitários e focos de inflamação foram descritos desde o encéfalo até a medula espinhal (Chagas 1911,1916).

Estudos experimentais começaram a ser realizados a partir da descoberta e evidência da doença de Chagas em portadores humanos. Vianna, (1911) relatou a presença de inúmeros focos inflamatórios múltiplos disseminados no córtex cerebral, dos animais (gatos), que apresentaram perturbações motoras, especialmente nos membros, tendo sido os membros posteriores mais frequentemente acometidos. As análises observadas em todo encéfalo (cérebro, tronco encefálico e cerebelo) nos modelos experimentais assemelharam-se ao descrito por Carlos Chagas nos exames *post mortem* em humanos (Chagas, 1909; Vianna, 1911). Outro trabalho experimental realizado em cães analisou a natureza e a importância das lesões que o *T. cruzi* determina para o sítio do SNC (Torres & Villaça, 1919). Os autores induziram a primeira infecção experimental em cães sem informar a cepa e inóculo, demonstrando um quadro de “encefalomielite benigna com hipertrofia glial e amastigotas dentro e fora das células nos focos inflamatórios ou distantes destes, com maior frequência na substância branca” (Torres & Villaça, 1919). Cães inoculados com *T. cruzi* desenvolveram um quadro de encefalomielite com a presença de parasitos no SNC, lesões degenerativas com reação glial e alterações vasculares. No quadro clínico, os cães apresentaram manifestação de astasia (dificuldade de se manter em pé), paralisias, convulsões e outras desordens nervosas. Focos inflamatórios dispersos no parênquima cerebral e na medula foram encontrados nos cães que apresentaram o sinal clínico de paralisia (Villela & Torres, 1926). Alencar & Elejalde (1959) também em infecção canina sem citar cepa e inóculo, observou que o *T. cruzi* foi encontrado parasitando o SNC onde foram observados focos de leptomeningite, infiltrados perivasculares e acúmulos de células com características “granulomatosas”. Queiroz (1975) em estudo histopatológico dos encéfalos e medulas espinhais de cães na fase aguda da infecção experimental pela cepa 12SF (cepa São Felipe) sem informar o inóculo, encontrou nódulos gliais, parasitismo discreto e difuso com predileção para substância branca tanto no encéfalo quanto na medula espinhal. O autor não encontrou lesões neuronais que justificassem a paralisia progressiva dos membros posteriores que ocorreu na segunda semana após inoculação.

Alencar & Elejalde (1960) estudaram o comprometimento do SNC de camundongos albinos, infectados com a cepa Y (sem citar inóculo), durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*, observando a presença de granulomas pequenos situados principalmente nas proximidades dos vasos sanguíneos. Jardim (1967) observou a diminuição acentuada das células de Purkinje na fase aguda da infecção em camundongos infectados com a cepa Y, sem informar o inóculo. Sanábria (1968 e 1969) estudou o cérebro de camundongos, sob inóculo intracerebral, através de microscopia eletrônica de transmissão (sem informar cepa e inóculo). Este autor observou 100% de infecção nos animais inoculados com parasitismo em macrófagos, astrócitos e axônios. Amaral e colaboradores (1975) estudaram o encéfalo de camundongos inoculados com 1.000.000 a 1.500.000 tripomastigotas das cepas Y, PNM e Berenice em cortes seriados, na fase aguda da infecção. Os animais infectados com as cepas Y e Berenice mostraram parasitismo encefálico baixo e parasitismo elevado em outros órgãos e aqueles infectados com a cepa PMN apresentaram intenso parasitismo encefálico e parasitismo de outros órgãos menos frequente. Os autores sugeriram com estes resultados a hipótese de um possível tropismo da cepa PMN para o SNC.

Mosquera & Herrera (1965) em infecção experimental em ratos (sem informar cepa e inóculo) observaram no cérebro alterações neuronais como cariólise, basofilia do citoplasma e perda da substância branca, encefalite focal e por vezes formações granulomatosas na substância cinzenta. A síntese proteica das células de Purkinje do cerebelo foi estudada por Campos (1969) durante a fase aguda da infecção, em ratos inoculados com a cepa Y (porém sem informar o inóculo). O autor observou a diminuição da síntese proteica diretamente proporcional ao parasitismo glial e sugeriu que as lesões das células gliais parasitadas repercutiriam no metabolismo dos neurônios dependentes da glia. Edgcomb (1973) estudando ratos silvestres (*Rattus rattus*) naturalmente infectados pelo *T. cruzi* encontrou o quadro de meningoencefalite e demonstrou granulomas cuja composição celular foi definida como astrócitos, linfócitos e micróglia.

Em estudo *post mortem* realizado em casos humanos, Elejalde (1960) estudando as lesões cerebrais em uma criança aos 11 meses de idade que faleceu na fase aguda da DC, encontrou células gliais parasitadas sem reação inflamatória e formações granulomatosas constituídas por micróglia, tanto na

substância branca quanto na substância cinzenta, mais frequente nas proximidades dos vasos. Brandão & Zulian (1966) encontraram diminuição na população neuronal em 52% dos casos analisados e constataram destruição celular. De Queiroz (1973) relatou o caso de um paciente de 62 anos de idade que após apresentar sintomas neurológicos por duas semanas veio a óbito, a autópsia revelou lesão semelhante a tumor no cérebro onde se encontrou o *T. cruzi*.

Libonatti & Maglio (1977) observaram em estudo de 221 portadores da DC (6,8% na fase aguda e 83,2 % na fase crônica) que o quadro de meningoencefalite ocorreu entre crianças de dois a quatro anos de idade. As formas convulsivantes são mais numerosas antes dos dois anos de idade. Queiroz (1978) estudou o encéfalo de cinco casos humanos, com idades entre quatro meses e dezessete anos, na fase aguda da DC, e as alterações encefálicas mais frequentemente encontradas foram edema, congestão e encefalite com variados graus de intensidade. Antes de morrerem, esses pacientes apresentaram convulsão. Um paciente apresentou encefalite multifocal glial com predileção para substância branca. Foi observado parasitismo moderado com amastigotas isoladas no interior das células gliais do córtex cerebral. Dois pacientes apresentaram lesão neuronal focal no córtex cerebral.

Achados histológicos no SNC durante a fase aguda da infecção incluem parasitismo em diferentes regiões do cérebro e da medula espinhal. Já intensos infiltrados inflamatórios foram observados nas meninges, leptomeninges e espaços perivasculares. Aumento das leptomeninges, edema cerebelar e formação de nódulos contendo astrócitos, micróglia, macrófagos e neutrófilos também estavam presentes no SNC (Pittela, 1993; Prata, 1994).

As manifestações em fase aguda, algumas fatais, impossibilitaram a comprovação e estabelecimento da forma nervosa crônica, que ficou por muito tempo sem ser explorada em pesquisas tanto humana quanto em modelos experimentais. Pesquisadores ao abordarem portadores crônicos observaram que estes apresentavam alterações cognitivas relacionadas à memória, atenção, alterações no eletroencefalograma e distúrbios de humor. (Prost et al. 2000; Rassi Jr et al. 2010; Silva et al. 2010). Apesar do acometimento do SNC ser descrito desde a descoberta da DC, os mecanismos envolvidos na gênese das lesões, e a extensão destas, ainda permanecem pouco esclarecidos.

2.3.3 O sistema nervoso central na reativação da doença de Chagas

Na década de 1980, casos de reativação da infecção chagásica em pacientes imunossuprimidos devido a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), provocada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), foram acompanhados de comprometimento nervoso (Pittella, 1993; Antunes et al. 2002). O quadro clínico da reativação da DC em pacientes imunossuprimidos inclui febre associada com nódulos dolorosos na pele, miocardite, anemia, icterícia, hepatite e grave envolvimento do SNC (Villalba et al. 1992; Altclas et al. 1996; Forés et al. 2007). A forma nervosa da DC voltou, a partir de então, a receber atenção em diversos estudos. Estes mostraram que situações imunossupressoras ocasionadas pela co-infecção com o HIV ou por outros motivos, como tratamentos com imunossupressores em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, neoplasias e/ou desnutrição, em pacientes com a forma crônica assintomática da DC frequentemente levavam à reativação dessa (Ferreira et al. 1991; Rocha et al. 1994; Da-Cruz et al. 2004; Cordova et al. 2008). Neste caso, o SNC é o principal alvo, apresentando graves lesões (Rocha et al. 1994; Antunes et al. 2002). Spina-França e colaboradores (1988) e Livramento e colaboradores (1989) observaram em portadores do HIV que apresentavam comprometimento do SNC anticorpos anti-*T. cruzi* no líquido cefalorraquidiano, e associaram então a presença do *T. cruzi* no SNC à gênese das alterações nervosas. Castilho e colaboradores (1990) publicaram um estudo em que observaram quadro de meningoencefalite e presença de lesões semelhantes a tumores no SNC de um paciente co-infectado com *T. cruzi* e HIV. Resultados semelhantes foram observados por Gluckstein e colaboradores (1992) num estudo de caso em que o paciente, portador do HIV, evoluiu para óbito após desenvolver um abscesso cerebral devido à infecção pelo *T. cruzi*. Rocha e colaboradores (1994) demonstraram que enquanto apenas 30% dos pacientes co-infectados reativaram a infecção no tecido cardíaco, 87% desenvolveram meningoencefalite grave, multifocal ou difusa, com necrose e hemorragia associadas a numerosos parasitos no tecido nervoso.

Estudos em modelos experimentais, avaliando a suscetibilidade entre linhagens de camundongos, revelaram que a presença da meningoencefalite aguda é dependente da linhagem do camundongo e que a sujeição à

imunossupressão leva ao reativamento da infecção na fase crônica (Silva et al. 1999; Roffê et al. 2003). Outro estudo demonstra que, na infecção experimental pelo *T. cruzi* o aparecimento da meningoencefalite e a reativação da infecção estão relacionados com a deficiência de IL-12 (Michailowsky et al. 2001). Além disso, Roffê e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão de moléculas de adesão celular (CAM), interações mediadas por VCAM-1 e VLA-4, presente nos leucócitos circulantes, estão relacionadas à formação da meningoencefalite aguda e a sua resolução na fase crônica da infecção. Dados em estudos atuais sugerem relação entre a participação do *T. cruzi* e desbalanço imune no aparecimento do comportamento depressivo em modelos experimentais independente da meningoencefalite aguda (Vilar-Pereira et al. 2012; 2015).

Estes estudos evidenciam o acometimento do SNC em ambas as fases da DC, e apontam para a existência de possíveis alterações cognitivas e patológicas, anda não elucidadas.

2.3.4 Células do sistema nervoso central susceptíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

O SNC é composto por dois tipos celulares: neurônios e células da glia. Os neurônios, principais células que compõem o tecido nervoso, são células especializadas na condução do impulso nervoso e constituem a unidade funcional do SNC. Durante décadas neurocientistas acreditaram que os neurônios fossem os únicos responsáveis por toda a comunicação no SNC mesmo sendo as células gliais muito mais numerosas (existe um neurônio para nove células gliais). A única função atribuída a essas células era de suporte estrutural para as células nervosas. No entanto, com o advento de novas técnicas e com a mudança do enfoque experimental, mostrou-se que as células gliais são capazes de se comunicar entre si e com os neurônios, sendo determinantes para a homeostasia do sistema nervoso (Fields, 2004). As células gliais incluem as micróglias, astrócitos e oligodendócitos. Sabe-se que as células da glia são responsáveis pela manutenção do equilíbrio, função de suporte, produção de mielina, fagocitose e manutenção das sinapses neurais. Além disso, expressam uma gama variada de canais iônicos, de receptores para neurotransmissores e de transportadores que juntos as tornam capazes de responder a uma série de sinais e modular respostas neuronais (Villegas et

al. 2003; Kandel et al. 2003; Guyton & Hall, 2006). Provavelmente uma das descobertas mais interessantes relacionadas às funções glias consiste no seu papel na geração de novas células neuronais no cérebro maduro. Atualmente, existem várias evidências de que células-tronco neuronais persistem na fase adulta e que estas células além de darem suporte à neurogênese, apresentam características de glia. Portanto, alguns tipos de células glias podem constituir células tronco neuronais enquanto outros tipos são capazes de regular a neurogênese (Villegas et al. 2003). Os tipos celulares que constituem a população glial no SNC encontram-se intimamente relacionados com os neurônios tanto durante o desenvolvimento do sistema nervoso, contribuindo para a formação estrutural de diversas áreas (Kettenmann & Ransom, 1995), como na fase adulta, mantendo a homeostase do sistema nervoso maduro (Banker, 1980). Durante processos inflamatórios, células neuronais e glias podem ser estimuladas por citocinas produzidas e liberadas por células imunes. Neurônios e células glias também são capazes de produzir citocinas promovendo, assim, sobrevivência neuronal e diferenciação, crescimento neurítico, síntese e liberação de neurotransmissores, regulação hormonal e plasticidade neuronal (Hopkings & Rothwell, 1995; Jeon & Kim, 2016).

Em modelo experimental canino foi observado a presença de parasitismo cerebral no interior da neurógliia (Torres & Villaça, 1919; Villela e Torres, 1926). Em relação ao parasitismo neuronal, pesquisadores observaram que raramente os neurônios se encontravam infectados (Villela & Villela, 1932). De fato, outros pesquisadores observaram parasitismo na neuroglia, macrófagos e células endotélias mas raramente nos neurônios (Pires, 1978; Pittella et al. 1990 e 1991). Da Mata e colaboradores (2000) observaram a presença de formas proliferativas de diferentes cepas do *T. cruzi* no interior de células com características ultraestruturais semelhantes a astrócitos. Porém, neste trabalho, não foram encontradas evidências de proliferação do parasito em outras células glias (micróglia e oligodendrócitos), indicando que os astrócitos são o principal alvo no tecido nervoso para invasão e proliferação do *T. cruzi*, dentre as cepas estudadas. Foi visto que no pico de parasitemia o tecido nervoso de ratos apresenta nódulos glias com ninhos de amastigotas, na ausência de processo inflamatório. Na conclusão desse trabalho, os autores discutem que a capacidade do tecido nervoso em eliminar os parasitos, provocando pouca ou

nenhuma morte neuronal, está provavelmente relacionada à reação nodular glial.

Recentemente, a linhagem de astrócitos humanos CRL-1718 (astrocitoma) mostrou-se altamente suscetível à infecção pelo *T. cruzi* (Vargas-Zambrano et al. 2013). A infecção dessa linhagem celular de astrócitos pelo *T. cruzi* resultou no aumento da expressão de moléculas de classe I e II do complexo principal de histocompatibilidade. Assim, astrócitos infectados pelo *T. cruzi* podem, potencialmente, interagir com células T e atuar como células apresentadoras de antígeno, realizando parte da imunidade específica anti-*T. cruzi*, que pode contribuir para o controle do parasito. Silva e colaboradores (2015) mostraram que em camundongos da linhagem C3H/He infectados pelo *T. cruzi* o parasito é encontrado principalmente em astrócitos no SNC, e alta frequência de astrócitos infectados foram encontrados localizados próximos a células mononucleares IFN γ + (IBA1+, compatíveis com migrógliã), tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção. Corroborando os achados *in vivo*, astrócitos de cultivo primário das linhagens C3H/He e C57BL/6 foram susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* e, quando estimulados com a citocina IFN γ tiveram a infecção favorecida. Ainda, o efeito do TNF no favorecimento à infecção *in vitro* e *in vivo* foi mostrado através do tratamento com anti-TNF, o qual diminuiu a presença de antígenos do *T. cruzi* no SNC sugerindo que em um ambiente inflamatório no SNC, composto de citocinas tais como IFN γ e TNF, a entrada e o crescimento do *T. cruzi* em astrócitos são facilitados, e que astrócitos podem servir como possíveis fontes do *T. cruzi* em casos de reativação da infecção em situações de imunossupressão.

Os mecanismos que atuam nos processos de invasão/estabelecimento do *T. cruzi* no tecido nervoso, bem como a gênese das lesões encefálicas e a não evolução para uma forma inflamatória crônica no SNC, apesar da evolução da forma cardíaca, podem ser considerados pontos importantes para investigação futura.

2.3.5 Alterações neurológicas na vigência de alterações eletrocardiográficas da doença de Chagas

O envolvimento cardíaco descrito desde os primeiros relatos (Chagas, 1911) é a mais frequente manifestação da forma crônica da DC e chega a atingir entre 20-40% dos indivíduos acometidos, sendo a causa mais comum

de cardiomiopatia na América Latina e principal razão de morte por doença cardiovascular nas áreas endêmicas (Rassi Jr et al. 2010; Marin-Neto & Rassi Jr, 2009).

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é essencialmente uma dilatação do miocárdio em que a inflamação crônica provoca destruição tissular progressiva, fibrose e, conseqüentemente um enfraquecimento progressivo da função contrátil do miocárdio (Andrade et al. 1983; Rassi Jr et al. 2010). Histologicamente, na CCC observa-se destruição das células do miocárdio, fibrose difusa, edema e infiltrados mononucleares, além de alterações no sistema condutor elétrico cardíaco. Estas lesões explicam a ocorrência frequente de bloqueios atrioventriculares, intraventriculares e disfunções no nodo sinusal (Chagas & Vilella, 1922; Rassi Jr et al. 2010). A destruição progressiva das fibras cardíacas e a intensa fibrose predispõem os pacientes à IC e arritmias ventriculares (Chagas & Vilella, 1922; Rassi Jr et al. 2010). Os sintomas mais comuns no homem são anormalidades no sistema condutor, bradicardias e taquicardias, aneurismas apicais, IC tromboembolismo e morte súbita. Já no eletrocardiograma (ECG) as anomalias mais comuns são bloqueio (intraventricular) do ramo direito do feixe de His, bloqueio fascicular anterior esquerdo, extrassístoles, ondas Q anormais e aumento do intervalo QRS e QTc (Chagas & Vilella, 1922; Rassi Jr et al. 2010).

Os indicadores do MS do Brasil (2011) revelam diminuição do número de óbitos por doenças infecciosas e parasitárias e aumento por doenças crônico-degenerativas, cardiovasculares e neurológicas. Outro fator preocupante é a alta frequência de acidente vascular cerebral (AVC) e de alterações de memória e de humor, como depressão, nos portadores da DC (Silva et al. 2010). Pouco se conhece sobre a fisiopatogenia das alterações neurológicas na DC, sendo proposto que estas resultem de lesões devido à presença do parasito no SNC, ou seja, sequelas das alterações cardíacas e/ou lesões inflamatórias teciduais (Mosovich et al. 2008; Silva et al. 2010). Cerca de 80% dos portadores de DC apresentam fatores que aumentam o risco de AVC, incluindo diabetes e hipertensão arterial (SBC, 2011).

Alguns autores sugerem que distúrbios do SNC estão relacionados às alterações cardíacas manifestadas frequentemente no ECG (Calvo-Romero et al. 2001; Hirashima et al. 2001). Goldstein (1979) avaliou 150 casos de pacientes com AVC e 150 casos controles pareados por idade e sexo para

determinar a frequência de anormalidades do ECG nos grupos, observando alterações em 92% dos casos, sendo específico de doenças neurológicas o prolongamento do intervalo QT em 45 % e onda T cerebral em 29%, incidência de 25% de arritmias comparadas com 3% do grupo controle, fibrilação atrial em 14% dos casos seguidos da arritmia ventricular em 5%, onde a extrassístole ventricular foi a mais frequente. Stober (1998) no estudo sobre arritmias cardíacas na hemorragia subaracnóide descreveram bradicardia sinusal em 23%, ectopia ventricular multifocal em 54%, intervalos assistólicos em 27% e fibrilação atrial em 4% dos casos no ECG.

Póvoa e colaboradores (2003) em 44 casos de AVC, a incidência de anormalidades nos traçados foi de 29,6%. As alterações consideradas específicas de lesões cerebrais foram infrequentes, o prolongamento do intervalo QT em 5,6%. De acordo com a revisão de Goldstein (2011) doenças cardíacas e doenças neurológicas se sobrepõem. Cerca de 20-30% dos AVCs estão relacionadas com doenças cardíacas. A IC, hipertensão, o aumento da idade, diabetes, tromboembolismo, disfunção ventricular esquerda, alargamento do átrio esquerdo, calcificação do anel mitral e aumento de trombo em átrio esquerdo são fatores de risco para AVC. Em contraponto o AVC pode afetar o coração, alterações eletrocardiográficas são observadas em 15% a 40% das pessoas com ACV. AVC pode causar grandes ondas T invertidas e arritmias cardíacas. Monitoramento para arritmias cardíacas e testes para lesão miocárdica são parte do padrão de avaliação de pacientes com AVC. A incidência de acidente vascular encefálico isquêmico de origem embólica (AVEi) na DC ainda não foi adequadamente definida. Embora estudos preliminares tenham sugerido que esses eventos possam constituir fatores prognósticos relevantes, seu risco não é conhecido na CCC (Marin-Neto et al. 2000) Sousa e colaboradores (2008) no seu estudo, cujo objetivo era definir estratégias de prevenção do AVEi a partir de uma análise de risco-benefício, indicam a utilização do anti-coagulante varfarina em pacientes de alto risco e de ácido acetilsalicílico ou varfarina nos de risco intermediário e concluem ser necessária a busca de novas propostas de prevenção do AVEi cardioembólico, especificamente direcionadas às particularidades da CCC, caracterizada por elevado potencial de complicações embólicas.

Os achados obtidos nos estudos descritos sugerem que as alterações do ECG encontradas nas doenças neurológicas são frequentes. No caso da

DC crônica, não está claro se as alterações neurológicas (i) resultam da presença do parasito no SNC, levando a lesões locais, (ii) são consequências secundárias de alterações cardíacas, como aneurismas e processos tromboembólicos (Mosovich et al. 2008; Silva et al. 2010) ou (iii) envolvem outro processo fisiopatogênico, como, por exemplo, os processos inflamatórios crônicos sistêmicos (Mosovich et al. 2008; Carod-Artal & Gascon, 2010; Silva et al. 2010; Carod-Artal et al. 2011; Vila-Pereira et al. 2012).

2.3.6 O estresse oxidativo na doença de Chagas

O estresse oxidativo (EO) é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando à morte por apoptose ou necrose (Halliwell, 2002). Todos os tecidos humanos sofrem lesões oxidativas, porém, por diversas razões, o SNC é especialmente sensível. Os neurônios são especialmente vulneráveis aos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (ROS) devido a sua alta taxa metabólica, associada à concentração elevada de ácidos graxos e metais de transição, vulneráveis à peroxidação e formação de radicais hidroxil (Reynolds et al. 2007). Adicionalmente, o SNC apresenta baixas concentrações de antioxidantes e capacidade reduzida de regeneração, tornando-se susceptível a EO (Reynolds et al. 2007; Hovatta et al. 2010). O consumo de oxigênio (O₂) pelo cérebro é muito elevado. Em humanos, o cérebro é responsável por cerca de 20% do consumo total de O₂. A grande demanda por O₂ deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios, mantendo o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores. Isto significa que os neurônios dependem muito da eficiência das mitocôndrias. Todavia, elétrons oriundos da cadeia de transporte de elétrons podem gerar ROS que, por sua vez, pode danificar a mitocôndria. Em contrapartida, a lesão de mitocôndria leva à produção de mais ROS, gerando um ciclo vicioso (Bakunina et al. 2015, Sanz 2016). A geração de oxidantes não resulta simplesmente de acidentes do metabolismo aeróbico, mas também do processo ativo de defesa imune do SNC. Embora essenciais para a sobrevivência, estes processos podem ser ativados impropriamente causando lesões aos neurônios e promovendo a neurodegeneração. Estudos

indicam que a ação central do EO levando à destruição oxidativa dos neurônios está associada a transtornos psiquiátricos e comportamentais. (Maes et al. 2009; Berk et al. 2011; Macêdo et al. 2013).

O EO pode ocorrer no curso da infecção pelo *T. cruzi* e durante o desenvolvimento da DC, levando à destruição do tecido com participação do parasito, por reações imunes mediadas por citotoxicidade (Martins et al. 1998) ou por danos às mitocôndrias (Sadek et al. 2002; Cardoso et al. 1999).

2.4 Alterações comportamentais na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

2.4.1 Alterações comportamentais

O comportamento representa uma relação entre a fisiologia e o ambiente externo e, portanto, variações fisiológicas podem induzir comportamentos específicos e previsíveis. Entende-se "alteração comportamental" como uma modificação de determinadas manifestações comportamentais, modificações estas, acima da considerada normal na grande maioria das pessoas (Skinner, 2003; Moreira & Medeiros, 2007). Alteração comportamental envolve considerar situações que favorecem o surgimento do comportamento alterado, as respostas fisiológicas, como a pessoa age, e as consequências de sua ação (Skinner, 2003). Portanto, uma pessoa está mais predisposta a agir de determinadas formas a depender dos eventos antecedentes e consequentes. (Thomaz, 2012). Quando uma pessoa passa a ter alguma dificuldade em lidar com os fatos de seu ambiente, como mecanismo de defesa, apresenta comportamentos antissociais ou, ao contrário, se contrai emocionalmente, podendo chegar ao isolamento e à depressão (Alchieri & Cruz, 2003)

Quando há alteração comportamental decorrente de infecção as modificações de comportamento são resultantes dos efeitos fisiopatológicos da infecção (Poulin, 1995; Kaushik et al. 2012; Chieff, 2015). A progressão da inflamação sistêmica para o SNC é explicada pela ativação de células da glia, as quais, além de produzirem citocinas pró-inflamatórias, expressam receptores para elas e são capazes de amplificação de seus sinais. Sugere-se que sinais provindos das citocinas alcancem o cérebro através de vias humorais, neurais e celulares. Estas vias incluem alguns mecanismos: (i) passagem de citocinas através de regiões da barreira hematoencefálica, como o plexo coroide e órgãos periventriculares; (ii) transporte ativo através de moléculas de transporte específicas e saturáveis do endotélio cerebral; (iii) ativação de células endoteliais, responsáveis pela subsequente liberação de segundos mensageiros como prostaglandinas e óxido nítrico (NO) para o parênquima cerebral; (iv) transmissão de sinais das citocinas através de fibras nervosas aferentes; (v) entrada para o parênquima cerebral via monócitos ativados (Matsumura & Kobayashi, 2004; Hopkins, 2007; Capuron et al. 2011; Smith & Ferguson, 2014).

No contexto de inflamação aguda, citocinas pró-inflamatórias promovem comportamentos descritos na literatura como "comportamento associados à

doença" (*sickness behavior*), que é tipicamente associado a sinais observados que incluem anedonia, fadiga, lentificação psicomotora, perda de concentração, diminuição do apetite e alterações do sono. O indivíduo apresenta dificuldade de realizar uma série de atividades o que talvez seja vantajoso por permitir maior gasto de energia com a defesa (Dantzer & Kelley, 2007; D'Mello et al. 2009; Capuron & Miller, 2011, Miller et al. 2013) (Figura 1.3).

Além disso, as citocinas comprometem a função e o metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina e interferem na neuroplasticidade cerebral. Mais especificamente, $IFN\gamma$, TNF, IL-1 e IL-6, induzem a síntese da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), provocando alterações no metabolismo de monoaminas cerebrais, desviando a via metabólica do aminoácido triptofano (TRIP). Este é um aminoácido essencial que em condições fisiológicas é requisitado para a biossíntese de proteínas, diminuindo conseqüentemente a produção de serotonina e produzindo substâncias neurotóxicas. A degradação do TRIP pela via das quinureninas (desencadeada pela atividade da IDO) tem grande importância neuropsiquiátrica, pois a degradação desse aminoácido implica na diminuição de produção de serotonina, conseqüentemente comprometendo a neurotransmissão serotoninérgica. O primeiro metabólito do TRIP que aparece na cascata enzimática da IDO é a quinurenina, que posteriormente é degradada em 3-hidroxi-quinurenina (3-HK), ácido quinolínico (QA) e ácido quinurênico (KA) (Dantzer, 2011, Maes et al. 2011), sendo o KA um antagonista do receptor do glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), o QA um agonista NMDA e potente toxina, e o 3-HK um gerador intenso de ROS causando EO (Capuron & Miller, 2011; Haroon et al. 2012; Vilar-Pereira et al. 2012; Miller et al. 2013). De modo interessante, drogas que aumentam os níveis de serotonina ou melhoram sua atividade, diminuíram o comportamento depressivo em animais em pesquisas pré-clínicas (Detke et al. 1995; Cryan & Lucki, 2000; Qiu et al. 2014; Du et al. 2014). Nesta mesma direção, estudos clínicos também mostraram que drogas que inibem a recaptação de serotonina atuaram como potentes antidepressivos (Hochstrasser et al. 2001; Kornstein et al. 2006; Fitzgerald & Bronstein, 2013).

Outro fator que resulta em alteração comportamental é o dano neuronal causado principalmente por microorganismos parasitando o SNC. Vários parasitos, como o *Toxoplasma gondii*, o agente causador da toxoplasmose, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* causadora da tuberculose e o protozoário

Plasmodium falciparum causador da malária, podem levar a uma série de mecanismos, tais como alteração de comunicação hormonal e de neurotransmissores e/ou intervenção direta nos neurônios e regiões do cérebro que medeiam a expressão comportamental (Henriquez et al. 2009; Linares et al. 2013; Corrêa et al. 2014; Francisco et al. 2015). Mesmo o sistema nervoso tendo uma plasticidade intrínseca que permite outras regiões assumir as funções de áreas lesadas, estes danos podem ser deletérios.

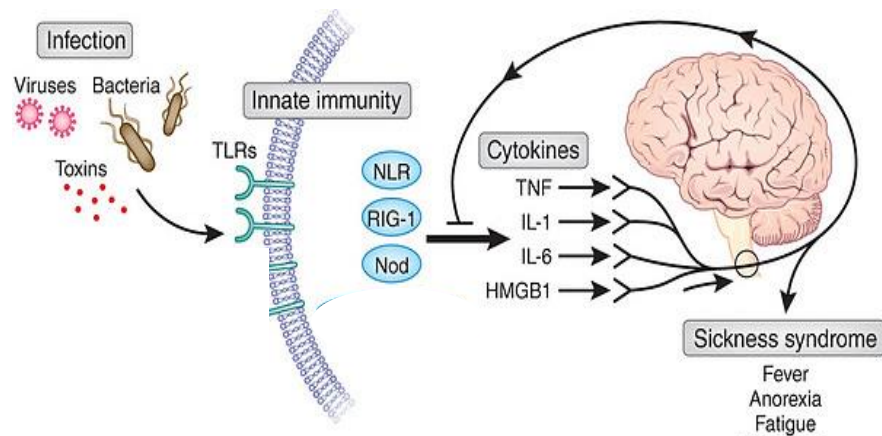


Figura 1.3: Mecanismos de ações cerebrais de citocinas. Citocinas pró-inflamatórias são liberadas por células imunes inatas ativadas na periferia, em resposta a agentes patogênicos levando à produção de citocinas pelas células nervosas que se difundem no parênquima cerebral. A produção de citocinas pró-inflamatórias induz um comportamento associado a doença que medeia os sinais clínicos da resposta do hospedeiro à infecção.

Apesar da existência de forma nervosa da DC ser matéria de debate, em hospedeiros imunocompetentes, a persistência aparentemente silenciosa de formas amastigotas do *T. cruzi* no SNC tem sido contestada pela demonstração de alterações comportamentais como distúrbios do sono, déficit de memória, perda da qualidade de vida e depressão, relatadas em crianças e adultos jovens durante a fase crônica da DC (Jorg & Rovira, 1981; Moncada, 1987; Silva et al. 2010). Distúrbios do sono e déficit de memória e comportamento semelhante à depressão foram detectados em modelos experimentais infectados pelo *T. cruzi* (Arankowsky-Sandoval et al. 2001, Vilar-Pereira et al. 2012, 2015). Silva e colaboradores (2015) investigaram que num

ambiente inflamatório no SNC, composto de citocinas como $IFN\gamma$ e TNF, a entrada e o crescimento do *T. cruzi* em astrócitos são facilitados, e que astrócitos podem servir como possíveis fontes do *T. cruzi* em casos de reativação da infecção em situações de imunossupressão. Além disso, os astrócitos infectados, afetados por danos infeccioso e inflamatório, produzem NO, o que pode contribuir para o espalhamento de dano/morte neuronal no SNC na infecção chagásica (Silva et al. 2015). Este trabalho trouxe evidências de que também em uma doença parasitária como a DC deve-se considerar o comprometimento e distúrbios gliais, como componentes intrínsecos dos processos neurodegenerativos que podem contribuir para alterações comportamentais e desencadeamento/amplificação de doenças crônico-degenerativas, numa visão integrada das alterações patológicas no SNC (Rossi e Volterra, 2009).

2.4.2 Ansiedade

A saúde mental é considerada como um componente essencial de qualidade de vida cognitiva ou emocional pela Organização Mundial de Saúde que define a saúde como um completo bem-estar físico, social e mental e não apenas ausência de doenças (WHO, 1986). A partir do século XX surge a noção de multicausalidade onde os fatores causadores das doenças foram relacionados a um agente etiológico, a um hospedeiro e ao meio ambiente (físico, social e cultural), ainda que agindo separadamente. Atualmente, além de se considerar que estes elementos atuam mais interligados, são ainda considerados os fatores psíquicos como igualmente causadores de doenças, passando o homem a ser visto como um ser bio-psico-social (Backes et al. 2009).

A ansiedade é um estado normal no indivíduo que resulta de uma reação normal a algo específico como um sistema de alarme. O que diferencia o estado normal do patológico é a intensidade da ansiedade (Gray, 1982; Bauer, 2002). A ansiedade é vista como uma emoção caracterizada por um estado de apreensão desconfortável, comumente orientada por reações do sistema nervoso autónomo (Van Riezen & Segal, 1988). Quando normativa, a ansiedade alerta o indivíduo para situações novas, inesperadas e/ou perigosas, permitindo preparar-se para enfrentá-las ou evitá-las, utilizando os seus mecanismos de defesa (Rosen & Schulkin, 1998). Assim, a ansiedade envolve

um conjunto de estratégias, que se estendem desde a percepção até à execução rápida de ações, tendo como foco a proteção do sujeito perante o perigo ou uma ameaça antecipada (Baptista, 2000). A ansiedade normal ou patológica compreende sempre três elementos: a resposta motora, a resposta cognitiva e a resposta fisiológica, podendo integrar um grande número de reações (Barlow, 1988, Fonseca, 2010). A resposta motora da ansiedade é descrita como um comportamento de evitamento, irrequietude ou desassossego. Além destas características, também pode ocorrer uma reação de imobilidade. Ao nível cognitivo, a ansiedade caracteriza-se principalmente por distorções cognitivas sobre a sua segurança, receios e grande apreensão. Por fim, a resposta fisiológica da ansiedade envolve uma ativação acentuada do sistema nervoso autónomo, que normalmente induz o indivíduo a apresentar diversas queixas somáticas (Fonseca, 2010). Se a ansiedade faz parte de um processo normal de desenvolvimento observável, quando é que esta se transforma em patológica? Rosen & Schulkin (1998) revelam que respostas de medo, tais como o congelamento, sobressalto, alterações da pressão arterial, frequência cardíaca e uma maior vigilância, são respostas comportamentais funcionalmente adaptáveis que surgem perante uma situação de perigo, impulsionando o indivíduo a dar as respostas mais adequadas. Já a ansiedade patológica manifesta-se nas perturbações de ansiedade, sendo um estado de medo exagerado expresso pela hiperexcitabilidade, hipervigilância e aumento da responsividade comportamental. Do ponto de vista filogenético, à medida que mamíferos foram submetidos a constantes desafios de sobrevivência, o SNC passou a apresentar inúmeras circuitarias neuronais responsáveis pelo controle de estratégias de adaptação às constantes alterações em seu *habitat* (Graeff, 1990).

Apesar de a ansiedade ser basicamente considerada emoção e, portanto, dotada de característica subjetiva, a literatura dispõe de metodologias capazes de identificar e mensurar alguns comportamentos que se relacionam com o nível de ansiedade em animais (Cruz et al. 1997). Eles são amplamente utilizados na investigação pré-clínica de novas drogas ansiolíticas, na avaliação fisiológica do mecanismo de ação dessas drogas, no teste empírico de hipóteses comportamentais e fisiopatológicas relacionadas aos transtornos de ansiedade em humanos, bem como no mapeamento da circuitaria neural que regula as reações de defesa frente a situações de perigo em potencial

(Rodgers, 1997; Lipkind et al. 2004). A antecipação de uma situação de perigo no ambiente tem início com processos perceptuais mediados por duas classes de estímulos, as que sinalizam perigo em potencial de maneira inata, independente de aprendizagem, e as que o fazem por meio de processos de aprendizagem, mediada pelo condicionamento clássico, e compartilham as mesmas finalidades: sinalizar e antecipar para o organismo alguma situação de perigo potencial no ambiente e deflagrar reações de defesa compatíveis (Gordon & Hen, 2004; Bourin et al. 2007; Carobrez & Bertoglio, 2005; Grillon, 2008). Os padrões comportamentais e as reações fisiológicas ativadas em decorrência do contato com essas fontes sinalizadoras de perigo em potencial são utilizados como medidas de ansiedade e, geralmente, apresentam grande correspondência com as medidas de ansiedade em humanos (Blanchard et al. 2008; Hohoff, 2009).

A DC apresenta um grande impacto na saúde do trabalhador, pois atinge o papel do homem na sociedade. O portador apresenta dificuldades para exercer atividades laborais que anteriormente exercia devido às consequências da doença crônica. Mota e colaboradores (2006) explicam que o desenvolvimento da sintomatologia para a DC pode estar relacionado a processos psicológicos como o estresse e a resiliência. Esses autores aplicaram um inventário de sintomas de estresse e outro inventário de resiliência em 100 portadores da DC crônica. O inventário de estresse avaliou sintomas físicos e sintomas psicológicos de estresse. O inventário de resiliência avaliou os seguintes fatores: 1) desesperança e dificuldades emocionais; 2) assertividade; 3) tenacidade e inovação; 4) empatia; e 5) sensibilidade emocional. O estudo concluiu que, independentemente de apresentar ou não sintomas da DC, os entrevistados manifestaram sentimentos de desesperança e dificuldades emocionais em nível alto ou moderado. Os sintomáticos apresentaram mais constantemente um nível elevado de desesperança e dificuldades emocionais, além de tenacidade e inovação. Também apresentaram mais sintomas psicológicos e físicos de estresse e menor capacidade de resiliência que os assintomáticos. Em vista da associação da DC com uma condição social bastante desfavorável, constatou-se em alguns estudos um número significativo de portadores apresentava evidências de ansiedade, seguida por manifestações depressivas (Hueb & Loureiro, 2005).

2.4.3 Depressão

O transtorno depressivo é uma síndrome comum e amplamente distribuída na população associada a comprometimento funcional dos indivíduos acometidos (Nestler et al. 2002; Holtzheimer & Numeroff, 2006; Van der Feltz-Cornelis et al. 2010). A prevalência pontual da depressão no mundo é de 4,4% (Ferrari et al. 2013). Estima-se que 50% das pessoas com o diagnóstico procurem tratamento com profissional da área de saúde; dessas, apenas 38% recebe tratamento considerado adequado (Wang et al. 2005). O impacto causado pela depressão pode ser medido pela estimativa de anos vividos com incapacidade (YLDs - *years lived with disability*): o transtorno depressivo é a segunda causa de YLDs no mundo (Ferrari et al. 2013). Sintomas depressivos incluem alterações somáticas e cognitivas, tais como: humor deprimido, anedonia (perda de interesse ou prazer em quase todas as atividades), irritabilidade, sentimentos de desvalia ou culpa, diminuição da capacidade de concentração, diminuição ou aumento do apetite, perda ou ganho de peso, insônia ou hipersonia, retardo ou agitação psicomotora, fadiga ou perda de energia. Adicionalmente, além do elevado índice de mortalidade associado ao suicídio, pacientes deprimidos são mais propensos a desenvolverem doença arterial coronariana e diabetes mellitus tipo 2 (Van der Feltz-Cornelis et al. 2010). Para o diagnóstico de depressão é necessário a constatação de no mínimo cinco entre nove sintomas, e exige a presença de pelo menos um sintoma (humor deprimido ou anedonia) presente na maior parte do tempo, com uma duração mínima de duas semanas (Associação Americana de Psiquiatria, 2000). O transtorno depressivo perturba o equilíbrio emocional de uma pessoa, levando à diminuição da qualidade de vida (Rucan et al. 2010). Os pacientes com depressão são de interesse à pesquisa e a clínica, visto que apresentam doença sujeita à recorrência e com maior número de comorbidades (Thales, 2010).

Apesar da alta prevalência e do impacto do comportamento depressivo nos indivíduos, a fisiopatologia do transtorno segue ainda como assunto a ser compreendido. Existem inúmeras razões que explicam a limitação no avanço das pesquisas acerca da fisiopatologia da depressão, entre elas; (i) a relativa inacessibilidade do cérebro, só possível por estudos pós-morte ou através de técnicas de neuroimagem que detectam mudanças na atividade neuronal,

provavelmente insuficientes para explicar o complexo conjunto de sintomas presentes na depressão; (ii) o fato de a maioria dos casos de depressão ser idiopática e o entendimento da etiologia ser restrito a alguns fatores de risco (eventos estressores, endocrinopatias, câncer, efeito colateral de algumas drogas); (iii) a não identificação dos “genes da depressão”, uma vez que estudos sugerem um padrão de herdabilidade poligênica, vulnerável a múltiplos fatores epigenéticos; e (iv) a limitação do diagnóstico fenomenológico da depressão, assentada na heterogeneidade clínica do transtorno e na sobreposição de sintomas com outros diagnósticos psiquiátricos (Krishnan & Nestler, 2008).

Ainda assim, a ciência vem há tempos propondo teorias fisiopatológicas do transtorno da depressão com base nos achados neurobiológicos disponíveis. A primeira delas foi a hipótese monoaminérgica, na qual a maioria dos antidepressivos está ancorada, como também as hipóteses neurotrófica, inflamatória, glutamatérgica e neuroendocrinológica.

Teoria monoaminérgica: Por muitos anos a hipótese predominante foi de que a depressão era causada por uma deficiência absoluta ou relativa de catecolaminas, especialmente noradrenalina, e que a mania, pelo contrário estava associada ao excesso dessas aminas (Schildkraut, 1965). A hipótese monoaminérgica surgiu no início da década de 60 a partir da observação clínica de resposta a drogas como a reserpina e a imipramina. A reserpina é um anti-hipertensivo que depleta as reservas de monoaminas e está associada a sintomas depressivos (Gardner & Boles, 2011). Na mesma época, achados experimentais indicaram que a imipramina inibia a recaptção da noradrenalina no cérebro e que era capaz de reverter os efeitos sedativos da reserpina em animais (Herting et al. 1961). Esses dados ajudaram a formular a hipótese monoaminérgica. Dentro da teoria monoaminérgica, o papel da serotonina foi demonstrado com relatos neuroquímicos no SNC um pouco mais adiante, em 1969 (Lapin & Oxenkrug, 1969).

Confirmando a impressão inicial, dados confirmam que a depressão não é causada por uma simples deficiência de monoaminas (Krishnan & Nestler, 2008), pois o efeito terapêutico dos antidepressivos só ocorre em algumas semanas (Ruhé et al. 2007). Mesmo com suas reconhecidas limitações, a teoria monoaminérgica continua sendo à base dos antidepressivos atualmente disponíveis, os quais foram desenvolvidos para aumentar a transmissão de

monoaminas. Apesar de ser esse o racional teórico dessas medicações, o uso crônico de antidepressivos leva a alterações neuroplásticas secundárias, que envolvem aumento da transmissão sináptica, expressão de fatores neurotróficos, transcrição de proteínas ligadas à resposta antidepressiva e um aumento na expressão de fatores de transcrição (Sairanen et al. 2005; Krishnan & Nestler, 2008). A habilidade dos antidepressivos em ativar proteínas cinases celulares que fosforilam a proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) mostra a ativação deste fator de transcrição como parte do mecanismo de ação destes medicamentos. CREB quando ativado liga-se ao elemento de resposta ao AMPc (CRE) no DNA para regular a expressão gênica de alvos como neurotrofinas e fatores tróficos que contribuem para a neuroplasticidade e modulação do humor mediadas pelo tratamento crônico com antidepressivos (Nair & Vaidya, 2006). Além disso, estudos em ratos mostraram que a fluoxetina (Fx) combinada a treinamento específico leva à extinção do medo condicionado (Karpova et al. 2011) e ao aumento da plasticidade sináptica do hipocampo, resultado que é abolido na presença da variante polimórfica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Bath et al. 2012). Observa-se que esses efeitos são bastante complexos, vão além do aumento da disponibilidade de monoaminas e podem ser mediadores do efeito antidepressivo dessas drogas.

A constatação de que as monoaminas podem ser coadjuvantes na fisiopatologia da depressão, somada ao lento início de ação das drogas disponíveis hoje, levou a novas teorias fisiopatológicas para serem estudadas.

Teoria neurotrófica: O BDNF é membro da família de fatores de crescimento neuronal, os quais estão implicados na diferenciação, crescimento e manutenção neuronal (Tardito et al. 2006; Chen et al. 2007; Numakawa et al. 2010). A teoria neurotrófica da depressão foi publicada pela primeira vez em 1997 (Duman et al. 1997). Partiu das seguintes observações: (i) o estresse reduz a expressão de BDNF no hipocampo em modelos animais; (ii) o estresse induz atrofia hipocampal em modelos animais; (iii) o hipocampo tem volume diminuído em estudos de neuroimagem de pacientes com depressão (Duman et al. 1997). A teoria neurotrófica postula que o estresse leva à redução da expressão do BDNF, o que, por sua vez, leva à atrofia de determinadas áreas cerebrais, como hipocampo e córtex cerebral.

Apesar da pesquisa básica em modelos animais ter demonstrado que o estresse reduz a expressão do BDNF, era difícil extrapolar esses achados para transtornos de humor em humanos. Estudos demonstraram que pacientes tratados com antidepressivo exibiam aumento na expressão de BDNF no hipocampo (Chen et al. 2001) e, posteriormente, estudos pós-morte mostraram haver redução da expressão de BDNF no soro de pacientes deprimidos (Karge et al. 2002) e no hipocampo de pacientes suicidas com depressão (Karege et al. 2005). Outros estudos confirmaram os níveis diminuídos de BDNF sérico em pacientes com depressão bem como o retorno a níveis comparáveis a controles após remissão induzida por antidepressivos (Aydemir et al. 2005; Molendijk et al. 2014). A partir de então, os achados em tecido cerebral e no soro de pacientes com depressão mostraram-se consistentes com os achados de pesquisa básica e com a hipótese neurotrófica.

Teoria inflamatória: Doenças sistêmicas infecciosas se caracterizam pela presença de sintomas gerais e inespecíficos, como mal-estar, fraqueza desânio, cansaço, inapetência, perda de interesse em atividades habituais, distúrbios de sono e irritabilidade. A esse conjunto de sintomas deu-se o nome de “*sickness behavior*” (Hart, 1988), um termo usado para descrever as mudanças comportamentais e subjetivas experimentadas pelos enfermos. Essas alterações comportamentais são fisiológicas e têm função protetora, já que reorganizam as prioridades do organismo de modo a facilitar a recuperação da infecção (Dantzer & Kelley, 2007). O *sickness behavior* é resultado da resposta do sistema imune ao patógeno invasor: ocorre liberação de mediadores inflamatórios, as citocinas, incluindo IL-1, TNF e IL-6, e de proteínas de fase aguda, incluindo o fibrinogênio e a proteína C reativa (PCR). Além da ação periférica, essas substâncias são capazes de atingir o SNC, seja cruzando a barreira hematoencefálica, seja via comunicação afferente do nervo vago, e deflagrar os comportamentos associados à doença (Dantzer et al. 2008). Portanto, o sistema imune se comunica com o SNC de modo a induzir essa ação protetora ao indivíduo, contudo, se a ativação for inapropriada ou prolongada, pode acabar sendo deletéria (Dantzer & Kelley, 2007).

Entre as observações que levaram à proposta da teoria inflamatória da depressão, estão: (i) as semelhanças entre os sintomas da depressão e do *sickness behavior*; (ii) a reversão em modelos animais do *sickness behavior*

com o uso de antidepressivos; (iii) a ocorrência de depressão em aproximadamente um terço dos pacientes que recebem interferon como tratamento de câncer ou doenças infecciosas (Dantzer et al. 2008). Evidências tornaram-se mais consistentes com a demonstração de que citocinas pró-inflamatórias induzem sintomas típicos de depressão em animais, não apenas aqueles compartilhados com o *sickness behaviour* (Frenois et al. 2007), e de que a injeção de citocinas pró-inflamatórias modula o metabolismo da serotonina, da noradrenalina e da dopamina, diminuindo sua disponibilidade (Felger et al. 2007). Além desses, outro mecanismo foi implicado na relação das vias inflamatórias com a depressão: a indução da enzima IDO por citocinas pró-inflamatórias. A ativação da IDO degrada o triptofano, o que acaba por limitar a síntese de serotonina (Schrocksadel et al. 2006) a partir desses achados, a hipótese da depressão como uma doença inflamatória passou a ser mais fortemente considerada (Dantzer et al. 2008).

As proteínas da fase aguda e as citocinas são consideradas marcadores periféricos da atividade inflamatória. A maior parte da evidência do papel das vias inflamatórias na fisiopatologia dos transtornos mentais vem de estudos que avaliaram esses marcadores (Dean, 2011). As técnicas utilizadas ainda requerem maior padronização, o que permitiria uma comparação mais adequada entre os estudos. Apesar dessas limitações, estudos de metanálises têm confirmado a correlação entre marcadores inflamatórios e depressão, tendo sido reportada associação positiva entre depressão e níveis elevados de IL-6 e TNF (Dowlati et al. 2010), IL-1 e IL-6 (Howren et al. 2009). Ainda não está claro, no entanto, se essas alterações são causa ou consequência da depressão (Dowlati et al. 2010). Existem evidências ainda de que as citocinas atuam sobre outros sistemas que têm sido implicados na fisiopatologia da depressão: ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Besedovsky & del Rey, 1996), efeitos negativos sobre a neuroplasticidade, incluindo diminuição do suporte neurotrófico, diminuição da neurogênese, aumento da atividade glutamatérgica e promoção do estresse oxidativo (Miller et al. 2009). Outros achados interessantes indicam que o estresse psicossocial pode ser gerador de resposta inflamatória, estando associado ao aumento de marcadores periféricos de inflamação (Kiecolt-Glase et al. 2005). Esses achados demonstram como as teorias fisiopatológicas da depressão são de algum modo interligado.

Teoria glutamatérgica: o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, fundamental na regulação da plasticidade sináptica, crescimento e diferenciação celular. Esse neurotransmissor exerce suas ações através da estimulação de receptores específicos, classificados com base em características estruturais e farmacológicas em metabotrópicos ou ionotrópicos, estes últimos incluem o N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolproptonico (AMPA) e cainato. Os receptores NMDA são canais iônicos com uma alta permeabilidade aos íons cálcio que podem ser modulados por ligantes e por voltagem. No estado de repouso, apresentam a ligação de um íon magnésio no interior do canal, bloqueando a passagem da corrente iônica. Mediante despolarização, geralmente obtida pela ativação prévia de receptores AMPA e influxo de sódio, o magnésio é deslocado e o canal desbloqueado, permitindo o influxo de cálcio (Lau & Tymianski, 2010; Molinoff et al. 1994). No entanto, um aumento da atividade glutamatérgica leva à excitotoxicidade sendo frequentemente associado a condições patológicas, como epilepsia, doença de Alzheimer, esquizofrenia e depressão (Kornhuber & Weller, 1997; Skolnick, 1999; Lau & Tymianski, 2010). Além disso, estudos bioquímicos (Nowac et al. 1993), eletrofisiológicos (Bobula et al. 2003) e comportamentais (Popik et al. 2000) têm demonstrado que o aumento da neurotransmissão monoaminérgica mediado pelos antidepressivos está associado com uma hipofunção dos receptores NMDA (Zomkowski et al. 2010). Moduladores glutamatérgicos, incluindo antagonistas dos receptores NMDA possuem propriedades antidepressivas em modelos animais, como o estresse inescapável (Trullas & Skolnick, 1990), o estresse crônico moderado (Papp & Moryl, 1994), o teste do nado forçado (FST) (Rosa et al. 2003) e o teste da suspensão pela cauda (TST) (Moretti et al. 2011). Adicionalmente, a administração de antagonistas de receptores NMDA mimetiza o efeito de antidepressivos, revertendo a anedonia induzida pelo estresse crônico moderado (Skolnick et al. 2009) e potencializa a atividade da Fx, venlafaxina e imipramina no FST (Rogoz et al. 2002; Pruus et al. 2010). Além disso, Riluzol, um fármaco que aumenta a captação de glutamato pelos astrócitos mostrou-se eficaz como monoterapia e como coadjuvante no tratamento de depressão (Zarate et al. 2004). Quetamina, um antagonista não competitivo do receptor NMDA, produz um efeito antidepressivo rápido e persistente em estudos clínicos (Kudoh et al. 2002). Estudos em modelos animais demonstraram que a

droga aumenta rápida e transitoriamente a transmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal possivelmente via inibição dos interneurônios GABA (Li et al. 2010).

A presença de sintomas da DC é um fator de risco para o desenvolvimento de sentimentos de desesperança e dificuldades emocionais (revisto em Silva et al. 2010). Portadores da DC crônica apresentam alterações comportamentais que vão desde ansiedade, depressão à síndrome de alexitimia (Jörg & Rovira 1981). O comprometimento de aspectos psicológicos foi relatado por Jörg, Storino & Sapino (1994), destacando que o paciente, ao tomar conhecimento da infecção chagásica, desenvolve uma sintomatologia reativa que o leva à depressão. Acreditam os autores que este processo é desencadeado pelo temor oculto da evolução maligna e pela impossibilidade de deter a doença. Neste sentido, os referidos autores destacaram a associação de manifestações psíquicas e mentais à DC, independentemente da forma apresentada, considerando que os aspectos psicológicos influenciam a evolução da enfermidade e a vida dos portadores. Afirmam que os portadores chagásicos apresentam perturbações neurológicas e psíquicas que são atribuídas exclusivamente ao *T. cruzi*, mesmo admitindo que estes possam desenvolver formações reativas frente ao conhecimento da positividade para a infecção, com manifestações de ansiedade e depressão. Para outros autores (Araújo et al. 2000; Gontijo et al. 1996; Marchiet et al. 1998), o que motiva as alterações comportamentais está associado à angústia relacionada ao diagnóstico e às limitações, que ocasionam uma mudança na qualidade de vida.

Os pacientes com a forma sintomática da DC têm mais sintomas físicos e psicológicos de estresse e ansiedade, e menor capacidade de resistência em comparação com indivíduos assintomáticos (Mota et al. 2006). Considerando a natureza crônica da DC, na persistência de estresse os pacientes podem desenvolver sintomas depressivos que podem ter um impacto negativo no desempenho funcional e qualidade de vida (Hueb & Loureiro 2005, Ozaki et al. 2011, Guimarães et al. 2014).

Recentemente mostramos que o comportamento depressivo na fase crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi* é independente da existência prévia de meningoencefalite aguda, e, portanto, não é uma consequência desta (Vilar-Pereira et al. 2012). O uso de benznidazol (Bz), uma droga

tripanossomicida, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* foi capaz de inibir a ocorrência de comportamento depressivo nos animais. Além disso, o tratamento com drogas anti-TNF (Pentoxifilina (PTX) ou Infliximab) também foi capaz de evitar o comportamento depressivo nesses animais (Vilar-Pereira et al. 2012).

No entanto, não tem sido explorada se a ansiedade está presente na fase crônica experimental da DC em associação com o comportamento depressivo. Ansiedade e depressão são termos usados para descrever estados emocionais associados a eventos estressantes ou dificuldades psicológicas em condições patológicas (Putilina, 2014). Essas mudanças de comportamento muitas vezes se desenvolvem em comorbidade e muitos dos seus sintomas são semelhantes. Além disso, a depressão é comum em pacientes com ansiedade, e a ansiedade é frequentemente relatada em pacientes deprimidos, os dois preditores de mau prognóstico (Nutt et al. 2006).

Há uma lacuna no conhecimento sobre a associação da DC, depressão, ansiedade e seu impacto sobre o prognóstico da doença clínica. Assim, modelos experimentais que reproduzem aspectos das alterações comportamentais (depressão e ansiedade) detectados em portadores da DC podem contribuir para o entendimento dos fatores fisiopatológicos destas alterações comportamentais.

2.4.4 Memória

Memória é a capacidade adaptativa dos organismos vivos de adquirir informações do meio externo, processá-las e guardar aspectos relevantes sobre elas para que possam ser evocados, mesmo que de maneira não consciente, em um tempo futuro (Chun & Turk-Browne, 2007). As etapas fisiológicas de formação de memórias se iniciam na aquisição dos estímulos ambientais por receptores sensoriais. Estas informações são processadas pelo SNC e exigem processos bioquímicos e celulares que levam a modificações plásticas nas sinapses para sua consolidação em longo prazo e eventual evocação (revisado por Dere et al. 2007; Izquierdo & Medina, 1999; Squire & Kandel, 2003; Lent, 2008).

O processamento mnemônico pode ser dividido em três processos: aquisição, consolidação e evocação. A aquisição consiste tanto da percepção

dos estímulos, sejam estes provenientes de fontes externas (experiências sensoriais da interação com o ambiente) ou internas (cognição, emoção) bem como da distribuição da informação percebida até os centros de análise e integração. Durante a fase de consolidação, a informação adquirida sofre um processo gradual de filtragem e fixação. A evocação é o processo mediante o qual a informação consolidada é recuperada e expressada (Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

Diversos mecanismos envolvidos no aprendizado da memória têm participação paralela e sequencial de várias cascatas bioquímicas. Grande parte das quais são iniciadas por receptores de glutamato (NMDA) no hipocampo e estruturas relacionadas anatomicamente. Algumas cascatas, no hipocampo, córtex entorrinal e córtex parietal posterior, resultam na formação de memórias de curta duração que perduram de 3 a 6 horas. Outras cascatas paralelas no hipocampo, córtex entorrinal, amígdala basolateral e várias áreas do córtex cingular resultam em consolidação de memória de longa duração (Cammara et al. 2007).

As redes neurais são recrutadas por informações úteis à sobrevivência do indivíduo. Por outro lado, ao longo da vida do indivíduo, a utilidade das memórias vai se modificando. A persistência do traço mnemônico será mais forte se estiver associado a um componente emocional (McGaugh, 2013; Reisberg & Hertel, 2003).

Memória do tipo episódica: A memória episódica é a memória que se refere às experiências vivenciadas pelo sujeito. Ela guarda aspectos como “o quê”, “de que forma”, “onde”, “o porquê” e em que ordem determinado evento aconteceu. Há evidências claras que a memória episódica pode ser representada por outros comportamentos que não envolvam somente a linguagem verbal (Griffiths & Clayton, 2001; Fortin, et al. 2004). Um roedor, por exemplo, pode preferir um determinado local que aprendeu ser fonte de alimento em detrimento de outro local visitado anteriormente em que a disponibilidade de alimento é escassa. Neste caso, há que se falar em memória do tipo episódica (Ennaceur & Delacour, 1988). A tarefa de reconhecimento de objetos pode ser utilizada para se avaliar diferentes componentes da memória do tipo episódica em roedores. Nesta tarefa, diferentes versões de preferência pela novidade são combinadas para medir a memória de reconhecimento de objetos (Dere et al. 2007; Ennaceur & Delacour, 1988), a

memória para localizações nas quais os objetos são explorados e a ordem temporal da apresentação dos objetos (Mitchell & Laiacina, 1998). O hipocampo está envolvido na evocação da memória episódica, enquanto outras estruturas do lobo temporal medial, como córtex perirrinal sustentam a memória baseada em familiaridade (Tulving & Markowitsch, 1998; Aggleton & Brown, 2006).

Memória aversiva: Seres vivos que vivenciam, presenciam ou tomam conhecimento de um fato traumático, podem desenvolver quadros clínicos psiquiátricos como reação aguda ao estresse, transtorno do estresse pós-traumático e/ou alterações permanentes de personalidade (Quevedo et al. 2003). Apesar da resposta ao estresse ser importante à sobrevivência, pode também resultar na formação de redes neuronais que facilitam sintomas associados de hipervigilância: resposta de sobressalto exagerada, labilidade afetiva, ansiedade, perturbação e hiperreatividade do sistema nervoso autônomo. Essa rede neuronal pode ser ativada por estímulos sensoriais externos ou internos, como estímulos cognitivos, afetivos ou somáticos (Cahill, 1995a). Comportamentos motivados pelo medo são respostas adaptativas cruciais para a sobrevivência. As memórias aversivas são solidamente armazenadas no cérebro, permitindo que seres vivos reconheçam e respondam adequadamente a situações ameaçadoras (Tinsley et al. 2004). Tal ameaça pode ser representada por um estímulo inato, como a presença de um predador ou um agressor da mesma espécie (Blanchard & Blanchard, 2001), ou por estímulos neutros, que por associação com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (Graeff & Brandão, 1999).

Estudos desenvolvidos com portadores crônicos da DC, sem especificar a forma manifesta da doença, que apontaram prejuízos cognitivos na DC (Jörg et al. 1972 Pereyra et al. 1992, Mangone et al. 1994 a e b) identificaram tanto o comprometimento da inteligência geral quanto o da inteligência específica, no que diz respeito aos processos mnemônicos, sendo que dois deles (Jörg et al. 1972; Mangone et al. 1994a) relataram também déficit de atenção. O estudo de Jörg e colaboradores (1972), além das deficiências citadas, apontaram para prejuízos quanto ao desempenho no que diz respeito à coordenação visomotora, à leitura, à escrita e à capacidade de compreensão. Destacaram como consequência destes prejuízos outras dificuldades, como pobres ajustes

ao senso comum, além de déficits em habilidades de vida diária. Portadores crônicos apresentam importante comprometimento da funcionalidade, em diferentes domínios como déficit cognitivo, comprometimento das atividades instrumentais e de atividades básicas de vida diária (Lima-Costa et al. 2009, Guariento et al. 2015).

3. Justificativa e Hipótese

O Ministério da Saúde (2015) indica que há aproximadamente 4,9 milhões de portadores crônicos de DC no Brasil. Cerca de 10 a 30 anos após a infecção, 20 a 30% dos portadores da DC evoluem para a forma cardíaca da DC.

O envolvimento do SNC na DC é reconhecido apenas na fase aguda dessa doença, onde a meningoencefalite se apresenta como importante causa de morte (Prata, 2001; Rassi Jr. et al. 2010). Na fase crônica, não existe um consenso quanto à existência de uma forma clínica definida com envolvimento do SNC, especialmente pela falta de uma base anatômica que possa caracterizá-la (Pittella, 1993).

Segundo a maioria dos estudos, os dados não permitem sustentar que o aparecimento de manifestações na fase crônica seja consequência de lesões neuronais ocorridas na fase aguda, especialmente porque as lesões neuronais, quando ocorrem, são vistas nos casos mais graves e fatais (Queiroz, 1978), impossibilitando que os indivíduos cheguem na fase crônica. Essas conclusões fizeram com que a forma nervosa na DC fosse menos estudada. Mais tarde, porém, estudos apontaram o comprometimento do SNC em portadores crônicos da DC, independentemente da ocorrência de alterações patológicas aparentes. Esses estudos detectaram a ocorrência de distúrbios cognitivos e alterações comportamentais como disfunção do sono, alterações em eletroencefalogramas quantitativos, perda de memória e depressão (Prost et al. 2000; Rassi Jr et al. 2010, Silva et al. 2010). Recentemente obtivemos dados que sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* provoca comportamento semelhante à depressão em modelos experimentais, especialmente determinado por fatores do parasito e do sistema imune, independente de inflamação ativa ou prévia (na fase aguda) no SNC (Vilar-Pereira et al. 2012, 2015). Em conjunto, esses dados evidenciam que o SNC é de fato acometido na DC, independente da fase da doença, e chamam a atenção para os possíveis danos patológicos e neurológicos que podem ocorrer.

Estes dados nos levaram a hipotetizar, adotando modelos de infecção experimental pelo *T. cruzi*, a existência de alterações neurológicas e comportamentais durante a fase crônica da infecção. Assim, buscamos modelos que reproduzam aspectos das alterações comportamentais

(ansiedade, depressão e distúrbios de memória) da DC, de modo a contribuir para a compreensão da patogenia da DC e desenvolvimento de terapias racionais, associadas ou não à terapia tripanossomicida, visando melhorar o prognóstico dos portadores da DC.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Investigar a relação entre as alterações neuropatológicas e a presença do parasito no SNC com as alterações comportamentais durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

4.2 Objetivos específicos

1. Investigar as alterações comportamentais (ansiedade, depressão e distúrbios memória) nos animais infectados pelo *T. cruzi*, procurando associar à presença do parasito e de alterações neuroquímicas;
2. Estabelecer modelos de associação de doença cardíaca crônica às alterações neurológicas e estudar o impacto destas associações nas alterações comportamentais;
3. Avaliar o efeito do anti-depressivo (Fluoxetina – inibidor da recaptção de serotonina) sobre as alterações comportamentais;
4. Avaliar o papel do parasito no desenvolvimento das alterações comportamentais, através da intervenção terapêutica com droga tripanossomicida (benznidazol);
5. Investigar a contribuição da resposta imune nas alterações comportamentais através da intervenção com imunorregulador (Pentoxifilina);
6. Avaliar aspectos neuropatológicos do SNC de animais infectados, através da detecção de estresse oxidativo, procurando associar alterações em áreas específicas do SNC (hipocampo e córtex cerebral) com as alterações comportamentais;
7. Avaliar a presença dos neurotransmissores glutamato e GABA e do fator neurotrófico BDNF, procurando associar alterações em áreas específicas do SNC (hipocampo e córtex cerebral) com as alterações comportamentais.

5. Material e Métodos

5.1 Animais, parasitos e infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas fêmeas de camundongos com 5-7 semanas de idade, da linhagem C57BL/6 infectados via peritoneal com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do Tipo I do *T. cruzi* suspensos em 0,2 mL de tampão salina estéril. As formas tripomastigotas utilizadas foram isoladas de um portador da DC crônica (Federici et al. 1964; Andrade, 1974), atualmente classificada como *T. cruzi* I (Zingales et al. 2009) e mantida por passagens seriadas em camundongos isogênicos a cada 35-45 dias, no Laboratório de Biologia das Interações (LBI/IOC), a fim de avaliar a suscetibilidade desses animais à infecção. A avaliação foi realizada de acordo com o desenho experimental, de forma cinética ou pontualmente em 120 e 150 dias pós-infecção (dpi). Os grupos experimentais são compostos de modo a atender a particularidade de cada desenho experimental. Quando possível os animais foram reutilizados em diferentes ensaios, visando a redução do número de animais utilizados. Os experimentos foram repetidos três vezes. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), chegam ao Biotério do Pavilhão Cardoso Fontes/IOC e são mantidos em adaptação por 10-14 dias em condições livres de patógenos específicos (SPF). Os animais são acondicionados em gaiolas de polipropileno dentro de estantes ventiladas ou microisoladores com capacidade para 5 animais, com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura e luminosidade controladas (12h/12h). Os testes comportamentais foram realizados no período da manhã (7-11horas) pelos mesmos avaliadores. Também foram analisados parâmetros clínicos (piloereção, apatia, prostração, mobilidade). De acordo com o desenho experimental, foram analisados de forma cinética parasitemia, peso corporal e temperatura retal. A parasitemia foi determinada semanalmente através do método de Brener (1962), que consiste em colocar 5µL de sangue obtido da cauda entre lâmina microscópica e lamínula (22 x22 mm). Foram observados 100 campos microscópicos utilizando a objetiva de 40x, sendo determinado o número de parasitos/mL de sangue. A parasitemia foi utilizada como parâmetro para definição dos vários estágios da infecção experimental pelo *T. cruzi*. De acordo com as observações realizadas previamente em nosso laboratório (Talvani et al. 2000; dos Santos et al. 2001),

os animais infectados apresentam um primeiro estágio caracterizado pelo raro encontro ou mesmo ausência do parasito na corrente sanguínea e um segundo pelo crescimento exponencial deste, que culmina entre os 42^o-49^o dia pós-infecção (dpi). Finalmente, um terceiro estágio, no qual o número de parasitos decresce na corrente sanguínea até a negatização da parasitemia ou encontro de raros parasitos no sangue circulante. Portanto, consideramos que a partir do 30^o dia após a negatização ou diminuição marcante da parasitemia os animais encontram-se em fase crônica, considerada a partir do 90^o dpi (Camandaroba et al. 2006). O estado clínico dos animais foi analisado semanalmente, assim como registros de morte. Para acompanhamento clínico, além da observação das condições físicas externas, os animais foram pesados usando balança própria para pesagem de roedores (balança Sartorius, ED623S-OCE; EUA) e a temperatura retal foi aferida usando termômetro retal (DT-610B *Thermocouple Thermometer*, EUA) semanalmente.

Os procedimentos experimentais foram realizados segundo as normas da Comissão de Ética de Uso de Animais da Fiocruz – CEUA/Fiocruz, através de protocolos aprovados por esta comissão (L004/09 e LW-10/14).

5. 2 Avaliação eletrocardiográfica

Avaliação eletrocardiográfica foi realizada visando investigar as possíveis influências das alterações cardíacas, já que não podemos excluir a comorbidade entre alterações cardíacas e neurológicas. Todos os animais infectados e não infectados foram tranquilizados com diazepam por via intraperitoneal (10mg/Kg), transdutores foram cuidadosamente colocados via subcutânea, de acordo com a derivação DII e analisados separadamente os grupos experimentais. Os traçados eletrocardiográficos foram gravados no período de 2 minutos no sistema digital (Power Lab 20/02) conectado a um amplificador de bio- 2 mV por 1 segundo (PanLab Instruments, Espanha). Os filtros foram padronizados entre 0,1 e 100 Hz, e os traçados foram analisados com o software Windows Âmbito V3.6.10 (PanLab Instruments, Holliston, EUA). Foram medidas as frequências cardíacas (batimentos por minuto, bpm), duração e intervalos do PR, QRS, QTc no intervalo de milissegundos (ms), como previamente descrito (Silverio et al. 2012).

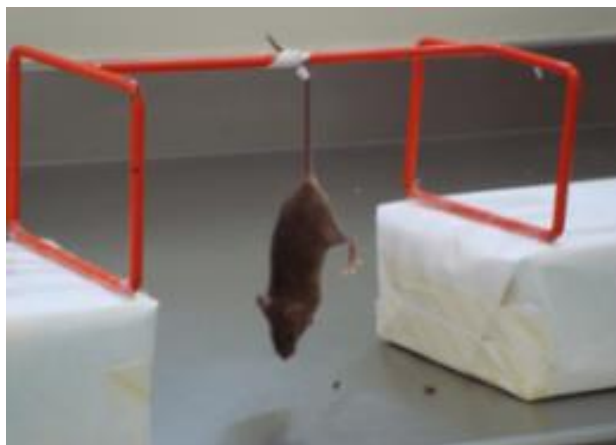
5.3 Avaliação comportamental

Todos os testes comportamentais foram conduzidos entre 8:00h - 15:00h e foram gravados com uma câmera de vídeo DSC-DVD810 (Sony, EUA). Para minimizar o estresse e aumentar a familiaridade, todos os testes comportamentais aplicados aos diferentes grupos experimentais foram realizados em um ambiente com 12 horas de luz e 12 horas de ciclo escuro, a uma temperatura ambiente de 22 ± 2 °C e um nível de ruído ambiente de aproximadamente 40 dB produzidos por um condicionador de ar. Os animais foram submetidos a testes comportamentais em 150 dpi. Nenhum animal foi retestado. Os testes comportamentais foram realizados a partir de testes menos estressantes para o mais estressante (campo aberto, grip strength, labirinto em cruz elevado, esconder esferas, suspensão de cauda e nado forçado). Para avaliar melhor se o comportamento associado a doença pode ter contribuído para as alterações comportamentais (Rogers et al. 2001), verificamos a temperatura retal com uma sonda retal (termômetro DT-610B, ATP, EUA), apatia e perda de peso corporal em todo o curso da infecção experimental nos grupos experimentais. Os óbitos foram registrados semanalmente.

5.3.1 Avaliação de depressão

Foram usados os testes de (i) suspensão de cauda (TST) (Steru et al. 1985); (ii) nado forçado (FST) (Porsolt et al. 1977).

Teste de cauda-suspensão (TST)



O TST é um dos modelos clássicos para avaliação da atividade antidepressiva de fármacos (Steru et al. 1985). Nesse teste, os animais são suspensos pela cauda impedidos de tocar o chão ou fugir e defrontam-se com o conflito entre o estresse físico gerado pela tentativa de fuga sem sucesso e a

motivação para continuar tentando. No momento em que esse estresse físico ultrapassa a motivação para a fuga, eles adquirem uma postura imóvel característica cuja duração e frequência aumenta ao longo do tempo. Esse modelo tem validade preditiva, uma vez que drogas com atividade antidepressiva utilizadas na terapia da depressão em humanos diminuem o tempo de imobilidade de camundongos nesse teste (Cryan et al. 2005).

O TST consiste em suspender o animal numa armação de ferro a 30 cm da base, prendendo sua cauda com auxílio de uma fita adesiva a 1 cm da ponta. O comportamento do animal foi gravado com uma câmera de vídeo (Sony, EUA) para 5 minutos. O tempo total de imobilidade foi medido. O animal foi considerado imóvel quando ele não estava lutando, tentando pegar a fita adesiva ou mostrando movimentos bruscos ou de torção do corpo.

Teste de natação forçada (FST)



Desde que foi descrito por Porsolt et al. (1977), o FST tem sido usado como um modelo experimental para o estudo da depressão. Este teste consistiu em colocar o animal dentro de um tanque cilíndrico de vidro (35 cm de altura, 25 cm de diâmetro) contendo água limpa de 24-26 °C até um nível de 20 cm acima do fundo. Os animais foram deixados no cilindro durante seis minutos. Inicialmente, os animais apresentam um comportamento de luta, caracterizados por vigorosa atividade, nadando em torno das bordas do tanque, aparentemente procurando escapar. Esta atividade, após alguns minutos diminui, seus movimentos passam a ser menos vigorosos e o animal passa a boiar, fazendo somente os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água, alternando a natação com momentos de imobilidade. A imobilidade reflete o estado de baixo humor relacionado com a impossibilidade de escape durante a situação experimental. (Porsolt et al. 1977). Após dois

minutos iniciais (habituação), o tempo total de imobilidade foi medido durante um período de quatro minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando passivamente na água, com movimentos leves somente para manter a cabeça acima da água ou completamente imóvel. Uma câmara de vídeo (Sony, EUA) foi colocada acima do cilindro de água para gravação do teste. A água foi trocada antes da introdução de cada animal. Após o teste o animal foi seco com gaze e recolocado na sua gaiola. Na retirada de cada animal infectado foi adicionado um volume de hipoclorito de sódio equivalente a 2% do volume de água para descarte da água utilizada.

5.3.2 Comportamento compulsivo inato

Foi utilizado o teste de esconder esferas (Njung'e & Handley, 1991).

Teste de Esconder Esferas



O teste de esconder esferas é um modelo experimental que está relacionado ao comportamento compulsivo inato. Naturalmente camundongos diante de objetos aversivos encontrados em seu ambiente apresentam comportamento espontâneo de enterrar estes objetos, considerado este comportamento como defensivo e inato dos animais. Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico transparente contendo 20 esferas de vidro distribuídas sobre a maravalha. Após o período de 30 minutos, cada animal foi retirado da caixa. Posteriormente, foi registrado o número de esferas de vidro enterradas na maravalha. Depois de testar cada animal, a

troca de maravalha foi realizada, e as esferas de vidro foram limpas com uma solução de álcool a 70% e seca com toalha de papel.

5.3.3 Ansiedade

Foi usado o teste de labirinto em cruz elevado (EFR 422, Insight, Brasil)

Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)



Um dos modelos mais amplamente utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos é o LCE, baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos (Lister, 1987). O teste é baseado em respostas naturais dos animais. Assume-se que os braços abertos do labirinto combinam dois componentes naturalmente aversivos aos animais: ser um ambiente novo e ser um espaço aberto, uma vez que não possuem paredes protetoras. Em contraste, os braços fechados com paredes altas representam, ao animal, um ambiente que oferece proteção contra estímulos potencialmente nocivos, tais como a presença de predadores. O procedimento empregado no LCE consiste em colocar o animal, individualmente, no espaço onde os braços abertos e os braços fechados se cruzam (zona central). Os parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade foram calculados, o número de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos braços abertos. Uma entrada no braço foi marcada quando todas as quatro patas dos animais estavam no braço visitado pelo animal.

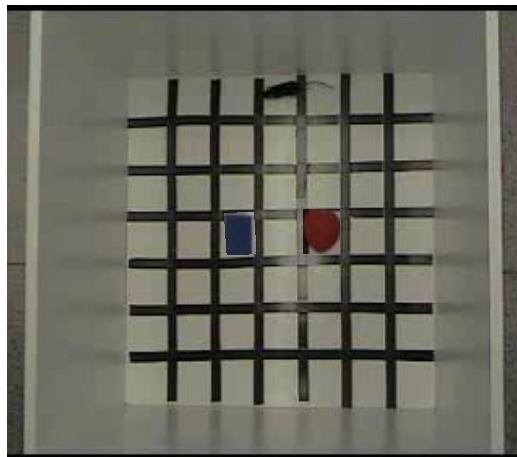
O LCE consiste de dois braços abertos cruzando com dois braços fechados (cada braço medindo 50 × 10 cm) com paredes laterais medindo 40 cm de altura. O comportamento do camundongo foi gravado com uma câmera montada acima do labirinto por 5 minutos. Antes de cada animal entrar no

teste, o labirinto foi limpo com solução de álcool a 70% e o aparelho foi seco para eliminar o odor do animal previamente testado.

5.3.4 Memória

Para avaliar memória/aprendizado foi utilizado (i) o teste de reconhecimento de objetos (Barros et al. 2006); (ii) o teste de memória de habituação ao ambiente (Dere et al. 2005) e (iii) o teste de esquiva passiva (Hollway, 1973).

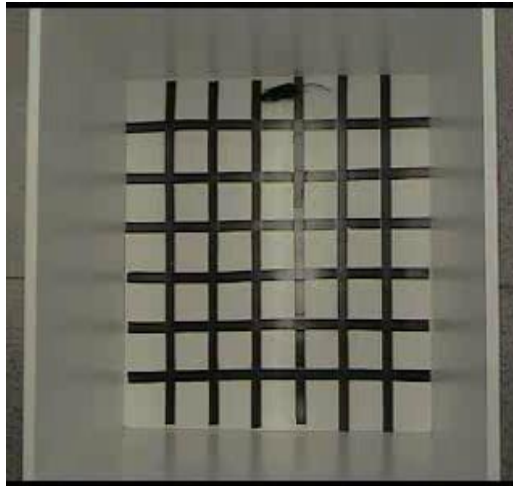
Teste de reconhecimento de objetos



O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no aparelho campo aberto (caixa quadrada de madeira medindo 60x60 cm com paredes brancas laterais de 60 cm e solo dividido em 49 quadrantes iguais). Esse teste é muito usado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos, novos, e já conhecidos. No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, considerado o dia da habituação, o animal foi colocado no canto superior esquerdo na caixa, e deixado por 5 minutos, sem nenhum objeto na caixa, para que se habitue ao ambiente. Após 24 horas, na sessão treino, o animal foi recolocado na caixa, com dois objetos exatamente iguais A1 e A2, exatamente no meio da caixa, paralelos, e a 10 cm das paredes laterais, e deixado por 5 minutos para que os animais explorem o ambiente livremente. Para testar a memória de longa duração o animal foi recolocado na caixa, 24 horas após, sessão teste, com dois objetos, um que ele já está familiarizado, A1, e um objeto totalmente distinto C e o animal teve 5 minutos para explorar o novo ambiente (Dere et al. 2005). A gravação da sessão foi iniciada quando o animal foi colocado no aparelho. A cada mudança de animal o campo foi limpo com álcool 70%. No

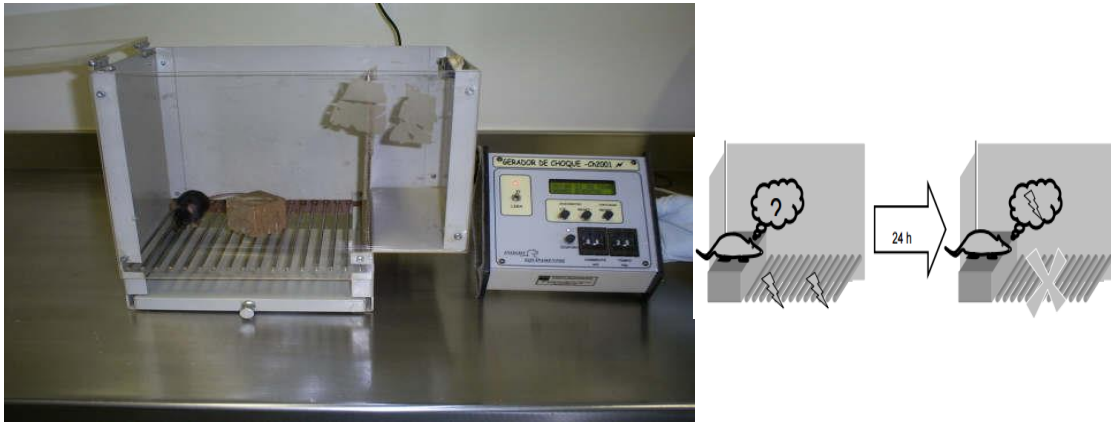
final de cada sessão o animal foi colocado em sua gaiola. O reconhecimento de objetos foi calculado pelo tempo gasto explorando o objeto novo e o tempo despendido a explorar o objeto familiar. Os critérios que definem o reconhecimento foram: i) dirigir o nariz para o objeto a uma distância de não mais de 2 cm e ii) tocar o objeto com o nariz. Sentar-se sobre o objeto não foi considerado como parâmetro de reconhecimento.

Teste de memória de habituação



A habituação é uma forma de aprendizagem na qual ocorre a redução da força de uma resposta a um estímulo novo, envolve a depressão da transmissão sináptica (Kandel & Hawkins, 1992). Na memória de habituação ao receber um novo estímulo (ambiente) o animal lhe dá a devida atenção, ao se repetir o estímulo, agora gravado na memória começa-se a proceder a habituação. Na sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto do aparelho, a partir do qual pode explorar livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após os 5 minutos, os animais foram devolvidos para a caixa de moradia. A sessão de teste de memória de longa duração foi realizada 24 horas após o treino, na qual se repete o procedimento do treino. A medida de memória foi avaliada contando o número de linhas totais cruzadas no aparelho no segundo dia do teste. A gravação da sessão foi iniciada quando o animal foi colocado no aparelho. A cada mudança de animal o campo foi limpo com álcool 70%. No final de cada sessão o animal foi colocado em sua gaiola. A duração de cada sessão foi de 5 minutos.

Teste de esQUIVA passiva (EP 104MR, Insight, Brasil)



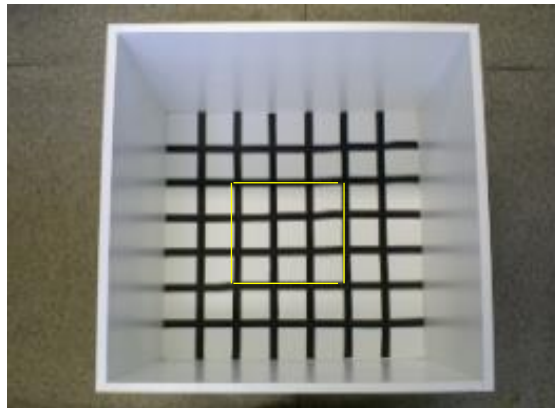
A resposta de esquia envolve a aquisição de um comportamento que adia a ocorrência de um evento aversivo futuro. O animal suprime uma resposta para evitar um evento aversivo que estava programado para ocorrer. Como envolve um processo de aprendizagem em que uma resposta deve ser inibida, esse tipo de esquia também é chamado de esquia inibitória. Utilizamos este teste na avaliação da memória aversiva em que o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um estímulo aversivo (leve choque aplicado nas patas). Com isso, numa segunda exposição à caixa de esquia ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. O aparelho consistiu de uma caixa de aço (20x20 cm) com um piso de grade de barras de aço (3 mm de diâmetro, espaçados de 1 cm), que pode ser eletrificado (0,6 mA por 3s) foi aplicado. Uma plataforma de madeira quadrada (4x4x4 cm) foi localizada na área central do aparelho, acima do piso de grade. No primeiro dia, os animais foram colocados na caixa por 1 minuto para explorar livremente e se acostumar com o novo ambiente (habituação), sendo retirado do aparelho logo após o término do tempo. Duas horas após o período de habituação, os animais foram colocados na plataforma de madeira e a latência para descer até o chão de grade com todas as quatro patas foi cronometrada. Quando os animais desceram, o choque elétrico foi aplicado, os animais foram retirados do aparelho por um tempo e depois retornaram para a plataforma, onde permaneceram por 10 segundos (formação de tempo necessário, pois os animais tinham que aprender a evitar o choque nas patas), retornando após esse tempo para gaiola (sessão treino). No segundo dia, o teste de retenção da memória do choque (sessão teste) foi realizado, quando foram obtidas as latências de descida da plataforma e nenhum choque foi aplicado. Para fins de padronização, foi estabelecido um teto máximo de

latência de descida da plataforma correspondente a 120 segundos. A diferença entre a latência da sessão treino e teste foi tomada como medida de memória. A cada mudança de animal o campo foi limpo com álcool 70%. No final de cada sessão o animal foi colocado em sua gaiola.

5.3.5 Locomoção / exploração

Para avaliar locomoção/exploração, foi utilizado o teste do campo aberto (Hall, 1941).

Teste campo aberto



O teste em campo aberto (*open field*) é uma medida comum de comportamento exploratório e locomoção em roedores, em que a qualidade e a quantidade da atividade podem ser avaliadas (Gould et al. 2009). O termo “atividade exploratória” é um termo de difícil definição, porém, é comumente usado em pesquisas que tem por base estudar o comportamento animal. Num sentido abrangente, o termo refere-se a todas as atividades que se relacionam com a obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas. Roedores, quando colocados em uma arena desconhecida sem pistas olfatórias, visuais ou auditivas, normalmente se direcionam para a borda e exploram todo o ambiente mantendo-se próximos à parede. Com o tempo, o animal habitua-se ao novo ambiente e sua ansiedade diminui, fazendo-o se aventurar cada vez mais em direção as partes centrais do campo antes de retornar para as bordas. A exploração deste perfil comportamental é a base do campo aberto (Bourin et al. 2007; Brooks & Dunnet, 2009). Cada animal foi colocado num mesmo quadrante no início de cada teste. O comportamento do animal foi registrado durante o período de 5

minutos o número de linhas atravessadas periféricas e centrais, caracterizado pelos deslocamentos entre um ponto a outro da arena. Este teste foi aplicado somente uma vez a cada animal, não sendo realizado habituação ou repetição em nenhum animal. A cada mudança de animal o campo foi limpo com álcool 70%. No final de cada sessão o animal foi colocado em sua gaiola.

5.3.6 Coordenação motora

Para avaliar a coordenação motora foi utilizado o teste rotarod (EFF 411, Insight, Brasil).

Rotarod (RRT)



Coordenação motora tem sido tradicionalmente avaliada em animais pelo teste de RRT, na qual o animal é colocado sobre uma haste horizontal que gira em torno do seu eixo longitudinal, o animal andar para frente para permanecer na posição vertical e não cair. RRT é um dispositivo automático que consiste de uma caixa de plexiglass com um cilindro de 8 cm de diâmetro, localizada aproximadamente 20 cm do solo, mantido em rotação por um motor. A caixa é dividida em quatro compartimentos, aproximadamente 10 cm de largura, o que permite a análise de quatro animais simultaneamente. Para habituação, os animais foram treinados no dia anterior ao dia do teste. Para isso, cada animal foi colocado para caminhar no tambor rotativo a velocidade mínima por cinco minutos. Para o teste, cada animal foi colocado no tambor já em movimento (velocidade inicial de cerca de 10 rotações por minuto). Na queda, o temporizador que controlou o tempo de equilíbrio foi automaticamente interrompido porque o equipamento tem um sistema instalado no piso de cada

compartimento para detectar o impacto da queda; os animais foram trazidos de volta ao seu tambor e o temporizador reativado, representando o total de quedas após cinco minutos (velocidade final de 37 rotações por minuto).

5.3.7 Força muscular

O teste de força de preensão é um método não invasivo amplamente utilizado para avaliar a força dos membros dos animais (van Riezen & Boersma 1969).

Grip strength meter (GPMT)



A força muscular (em gramas) foi avaliada através do medidor de força de preensão (FEP 305, Insight, Brasil). O GPMT baseia-se na tendência natural do animal em segurar uma barra quando suspenso pela cauda. O animal agarra uma barra de metal horizontal, enquanto é ligeiramente puxado pela cauda. A barra está ligada a um transdutor de força que mede o pico de força de tração (em gramas). O objetivo deste teste é avaliar o tônus muscular dos animais e/ou a força dos membros, ao mesmo tempo. Mudanças na força de preensão ter sido interpretado como evidência de redução ou aumento da força muscular.

5.4 Intervenções terapêuticas

Grupos de animais não infectados (NI) e animais infectados (120 dpi) foram submetidos aos esquemas de tratamentos por 30 dias consecutivos: (1) não tratados; (2) injetados com salina; (3) Fx (Prozac, Eli Lilly, Brasil; 0.1 mL;

10 mg/Kg/dia por gavagem); (4) dose sub-ótima de Bz (25mg/Kg/dia por gavagem; LAFEPE, Brasil); (5) inibidor de síntese de TNF (PTX; Trental, Sanofi, Brasil, 20mg/Kg/dia via intraperitoneal) (Vilar-Pereira et al. 2012); (6) associação de terapia PTX) com Bz (25mg/Kg/dia) (Vilar-Pereira et al. 2016). Em 120 dpi foram sacrificados grupos de 8-10 animais infectados e 5 NI (pré-terapia). Os animais submetidos aos tratamentos foram sacrificados ao final dos tratamentos (pós-terapia).

5.5 Quantificação de carga parasitária no SNC por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O DNA foi extraído das amostras previamente pesadas de tecidos cerebrais dos animais infectados usando 1 mL de TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, EUA) para cada tecido com posterior adição de 200 µL de clorofórmio (Merck, EUA) e 2 minutos de incubação. Após centrifugação a 12000xg, a 4 °C, por 15 minutos foram obtidas a fase orgânica e interfase e o DNA foi precipitado adicionando 300 µL de etanol 100% (Merck, EUA). Incubou-se por 3 minutos para sedimentação do DNA. Centrifugou-se a 2000xg por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi lavado duas vezes em 1 mL de uma solução contendo 0,1 M de citrato de sódio (Sigma-Aldrich, USA) em etanol 10%. Incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente, com agitações periódicas e centrifugou-se a 2000xg por 5 minutos a 4 °C. O pellet de DNA foi ressuspensionado em 1,5 mL de etanol 75% e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente (com agitações periódicas). Centrifugou-se a 2000xg por 5 minutos, a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante e secou-se o DNA por 10 minutos. No final, dissolveu-se o DNA em 100 µL de NaOH 8 mM (Sigma-Aldrich, EUA). Centrifugou-se a 13000xg por 10 minutos. Foram utilizados primers *Cruzi 1* (Sequência: 5' AST CGG CTG ATC GTT TTC GA 3') e *Cruzi 2* (Sequência: 5' AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA 3') (Thermo Fisher Scientific, EUA). A concentração final de TaqMan® Master Mix (Roche, USA) foi de 2x, 750 nM para cada primer de *T. cruzi* e 50 nM para a sonda de *T. cruzi* tendo a reação um volume total de 20 µL. Todas as reações foram realizadas em duplicata. A amplificação teve as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos para desnaturação inicial e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação e 58 °C por 1 minuto para anelamento/extensão (ABI Prism 7000, Applied Biosystems, EUA).

5.6 Análise da expressão gênica do fator neurotrófico BDNF por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Os tecidos cerebrais córtex e hipocampo foram removidos, pesados e congelados em RNA later (AM7021, Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi extraído a partir da mesma amostra utilizada para quantificação da carga parasitária usando o TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, EUA). Após extração, o RNA foi purificado utilizando o kit RNeasy (QIAGEN, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após quantificação e tratamento com DNase, procedeu-se à síntese de cDNA com o kit SuperScript® III VILO™ MasterMix (Thermo Fisher Scientific, EUA). A reação total (20 µL) para a transcriptase reversa continha 4 µL de SuperScript® III VILO™ MasterMix, 4 µL de H₂O DEPC e no máximo 2,5 µg de RNA total. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos, a 42 °C por 60 minutos para a transcrição e 85 °C durante 5 minutos para terminação da reação. A dosagem de cDNA foi efetuada no Qubit® 3.0 Fluorometer utilizando o kit ssDNA (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para análise da expressão gênica foi realizada a reação de qRT-PCR utilizando TaqMan®, seguindo as instruções do fabricante. Foram usadas as sondas TaqMan® para o fator neurotrófico BDNF (Mm04230607-s1) e para o gene endógeno GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (Mm99999915 g1) e HPRT (Mm01545399 m1) (Thermo Fisher Scientific, EUA). A mistura de reação (10 µL) continha 2 µL de cDNA de cada amostra, 5 µL de Master Mix TaqMan 2x, 0,5 µL das sondas acima descritas e 2,5 µL de H₂O DEPC. Todas as reações foram realizadas em duplicata. As condições do ciclo da PCR foram as seguintes: 95 °C por 10 minutos para desnaturação inicial e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento/extensão (Vii7, Applied Biosystems, EUA).

5.7 Determinação dos neurotransmissores glutamato e GABA no SNC por ressonância nuclear magnética (RNM)

Foram analisados córtex e hipocampo para detecção dos neurotransmissores Glutamato e GABA: Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos a 25 °C em um espectrômetro VNMRS-500 (Agilent, EUA) a 499,78 MHz. Os espectros foram adquiridos com uma largura espectral de 7022 Hz, com 16384 pontos e 64 acumulações. Para que fossem feitas análises

quantitativas foi usado um intervalo para relaxação (d1) de 35 s. As amostras foram dissolvidas em D₂O 99,9% (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., EUA) com 0,5 mM de TMSP-2,2,3,3-D4 98% (Sodium-3-Trimethylsilylpropionate, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) usado como referência para o deslocamento químico (0,00 ppm) e como padrão para as análises quantitativas.

5.8 Análise de estresse oxidativo no SNC pelo método de TBARS

O nível tecidual de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex e hipocampo foi determinado pelo método de Ohkawa (1979). O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um complexo colorido. Alíquotas de homogenatos teciduais foram incubadas, a temperatura de 100 °C por 45 minutos, em meio contendo 0,45% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1,4 M de ácido acético pH 3.5, e 0,6% de TBA e incubados a 100 °C por 1 hora. Após incubação o produto da reação foi extraído com butanol e lido espectrofotômetro (Spectra Max M5, Molecular Devices) em um comprimento de onda de 532 nm.

6. Análise Estatística

Médias aritméticas e seus desvios-padrão foram calculados. Os testes *t-Student*, ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, quando apropriado, foram usados para estabelecimento das diferenças significativas, $P < 0,05$ (*, &, #), $P < 0,01$ (**, &&, ##) ou $P < 0,001$ (***, &&&, ###), calculados pelo programa estatístico *Graphpad Prism* versão 5.0.

7. Resultados

7.1 Parasitemia, mortalidade e inexistência de *sickness behavior* nos animais durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Inicialmente foi estabelecido um modelo murino que reproduz aspectos da DC crônica. Quando infectados com a cepa Colombiana (Tipo I) do *T. cruzi* (Zingales et al. 2009, 2012), os camundongos da linhagem C57BL/6 apresentaram pico de parasitemia entre 42-45 dpi (fase aguda). Com a diminuição da parasitemia em 90 dpi (fase crônica), raramente foram encontrados tripomastigotas no sangue em 150 dpi (Figura 7.1A), corroborando os nossos dados anteriores (Vilar-Pereira et al. 2012, 2015). A curva de sobrevivência, comparada com animais NI pareados por idade e sexo, revela que cerca de 70% dos animais infectados sobreviveram à fase aguda, sem tratamento tripanossomicida, e desenvolveram infecção crônica, como anteriormente descrito (Talvani et al. 2000, Silverio et al. 2012, Pereira et al. 2014a) (Figura 1B). Durante toda a cinética da infecção experimental pelo *T. cruzi*, os animais, pareados por sexo e idade, foram acompanhados semanalmente quanto ao seu peso, expresso em gramas (g) e à sua temperatura expressa em graus Célsius (°C). Não detectamos alterações significativas na variação de peso (18.56 ± 0.63 NI x 17.98 ± 0.57 infectados em 150 dpi) (Figura 7.1C) nem da temperatura retal (39.70 ± 0.37 NI x 39.75 ± 0.26 infectados em 150 dpi) (Figura 7.1D) durante o período de experimentação, fases aguda e crônica, ao se comparar animais NI com animais infectados. Após o exame físico geral, os animais cronicamente infectados quando comparados aos animais NI, pareados por sexo e idade, não apresentaram apatia, prostração, piloereção, hiperalgesia, obesidade ou caquexia nos parâmetros clínicos analisados. Portanto, neste modelo de infecção pelo *T. cruzi* não observamos *sickness behavior* nas fases aguda e crônica da infecção. Além disso, este modelo reproduziu aspectos importantes da fase crônica da DC, como a alta taxa de sobrevivência e a baixa parasitemia, e nos permitiu testar se os animais infectados com a cepa Colombiana apresentam alterações cardíacas e comportamentais de depressão, ansiedade e déficits mnemônico.

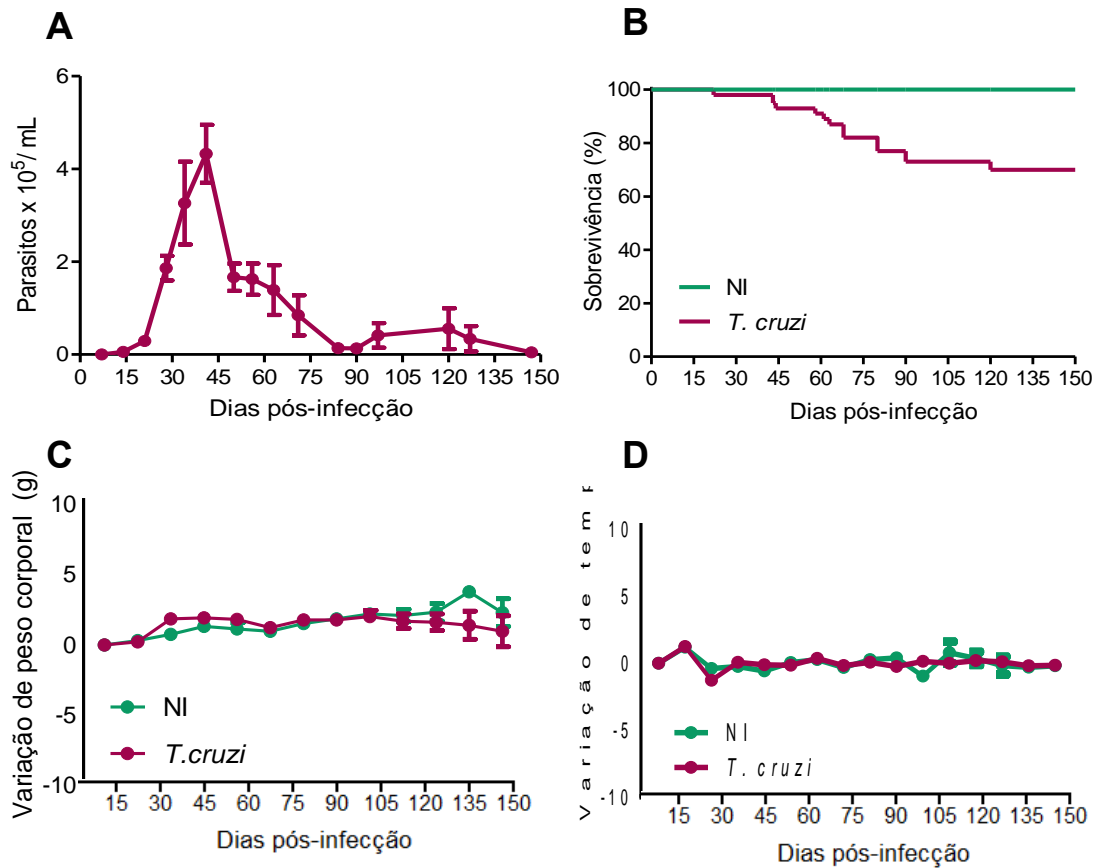


Figura 7.1: Curva de parasitemia, mortalidade e ausência de comportamento associado à doença (*sickness behavior*) durante a infecção experimental de camundongos C57BL/6 pelo *Trypanosoma cruzi*. Os animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*. (A) Parasitos circulantes foram detectados a partir de 14 dpi, o pico de parasitemia ocorreu em 42 dpi. Na fase crônica (90-150dpi) pouco ou nenhum parasito foi encontrado no sangue periférico. (B) Curva de sobrevivência, comparada com animais não infectados (NI) pareados por idade e sexo, revela que cerca de 70% dos animais infectados sobreviveram à fase aguda e desenvolveram a infecção crônica. Na avaliação de *sickness behavior* avaliamos a variação de peso corporal (C) e temperatura corporal usando uma sonda retal (D). Durante o curso da infecção camundongos C57BL/6 não apresentaram alterações significativas ($p > 0,05$) no peso corporal e na temperatura retal. Os grupos foram constituídos de 10-18 camundongos. Dado representativo de três experimentos independentes.

7.2 Alterações elétricas em camundongos da linhagem C57BL/6 cronicamente infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*

A forma cardíaca da DC é uma das manifestações clínicas mais graves e frequentes, podendo levar os pacientes à morte súbita (Rassi et al. 2010). A existência de modelos experimentais que reproduzam a CCC (Talvani et al. 2000; dos Santos et al. 2001; Medeiros et al. 2009; Silverio et al. 2010, Pereira et al. 2014 a e b, 2015; Vilar-Pereira & Pereira et al. 2016) pode contribuir de forma importante para avançar no estudo da patogenia da DC. Em nosso estudo, não foram observadas alterações elétricas nos animais NI analisados em paralelo aos animais infectados pelo *T. cruzi* (150 dpi). Anormalidades elétricas relevantes, detectadas em pacientes com DC, como arritmia (ART), bloqueio atrioventricular de segundo grau (BAV2) (Figura 7.2A), frequência cardíaca (batimentos por minuto) diminuída, prolongamento dos intervalos PR e QT corrigido pela frequência cardíaca (QTc), foram reproduzidas em camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Figura 7.2B).

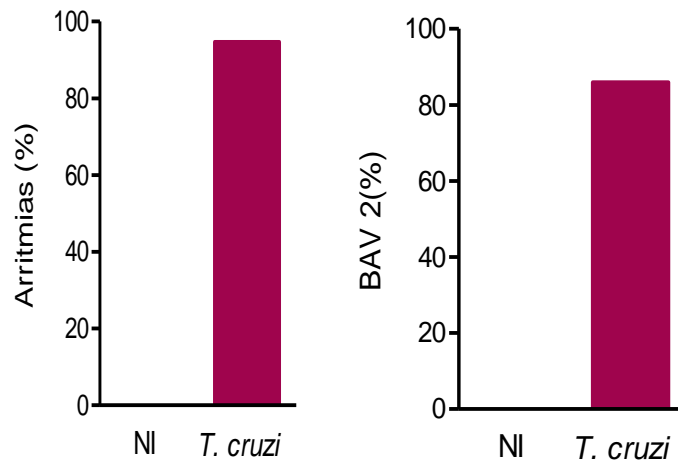
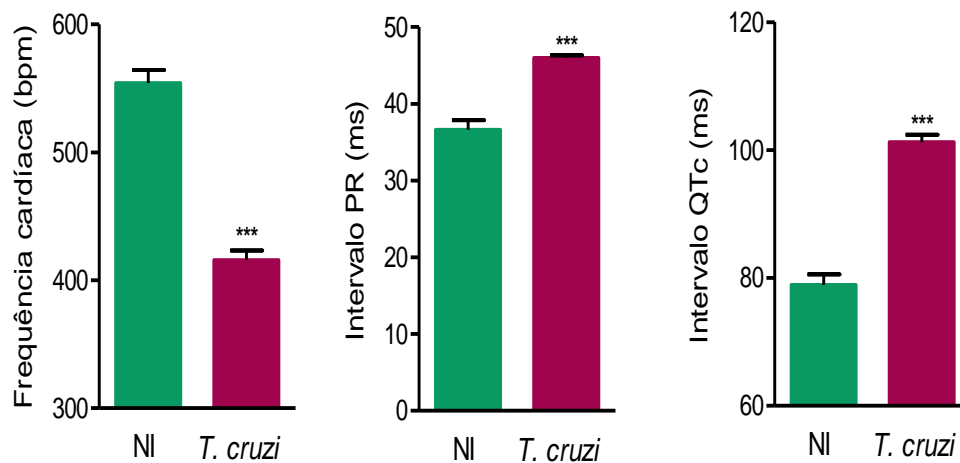
A**B**

Figura 7.2: A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* induz alterações eletrocardiográficas (ECG) durante a fase crônica da infecção (150 dpi). Registro do ECG de animais infectados em comparação com não infectados (NI) pareados por idade e sexo. (A) Resumo dos dados dos grupos para a frequência dos animais que apresentam arritmias e bloqueio atrioventricular de segundo grau (BAV2), respectivamente. (B) Os gráficos indicam o resultado da análise de registros de ECG mostrando batimentos cardíacos, duração (ms) do intervalo PR e intervalo QTc, respectivamente. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-6 camundongos. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

7.3 Comportamento semelhante à depressão está presente em camundongos C57BL/6 na infecção experimental crônica pelo *Trypanosoma cruzi*

Para avaliar a existência de comportamento semelhante à depressão nos animais cronicamente infectados, usamos o TST e FST. Os resultados obtidos, em 150 dpi, mostraram que nos camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* houve aumento no tempo de imobilidade no TST ($p < 0,001$) (Figura 7.3A) e FST ($p < 0,001$) (Figura 7.3B) quando comparados com os animais NI, pareados por sexo e idade. Estes dados indicam a existência de comportamento semelhante à depressão em animais cronicamente infectados pelo *T.cruzi*.

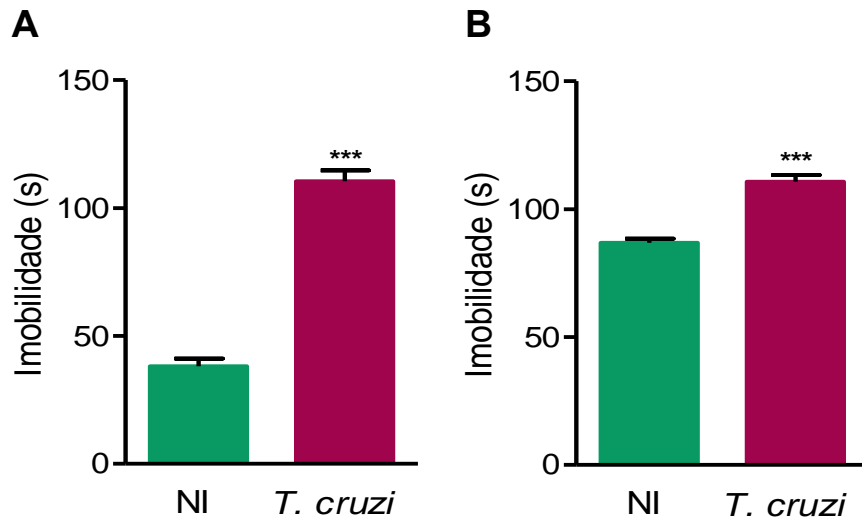


Figura 7.3: Infecção com *Trypanosoma cruzi* induz comportamento depressivo em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). Os animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste de suspensão de cauda (A) e nado forçado (B). A quantificação do tempo de imobilidade foi observada no período de 4 ou 5 minutos, respectivamente. Foi observado aumento do tempo de imobilidade nos animais infectados quando comparados aos não infectados (NI). Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-18 camundongos. Dados de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

7.4 Ausência de comportamento compulsivo inato em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

Para testar se o comportamento compulsivo inato está presente na infecção experimental crônica pelo *T. cruzi*, submetemos camundongos C57BL/6 ao teste de esconder esferas. Analisamos a latência para iniciar o comportamento espontâneo de enterrar as bolas de vidro presentes em seu ambiente, e o número de bolas escondidas em sessões de 30 minutos. Camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi) apresentaram aumento na latência ($p < 0,001$) quando comparados aos animais NI (Figura 7.4A). O percentual de animais infectados que não esconderam as esferas foi de 60% quando comparados aos não infectados (Figura B). Além disso, estes animais mostraram diminuição do número de bolas escondidas ($p < 0,001$) quando comparados aos animais NI (Figura 7.4B), alteração esta não detectada em 5-9 dpi, mas observada entre 33 a 86 dpi (Figura 7.4C). Portanto, camundongos C57BL/6 não mostraram o comportamento inato compulsivo inato na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

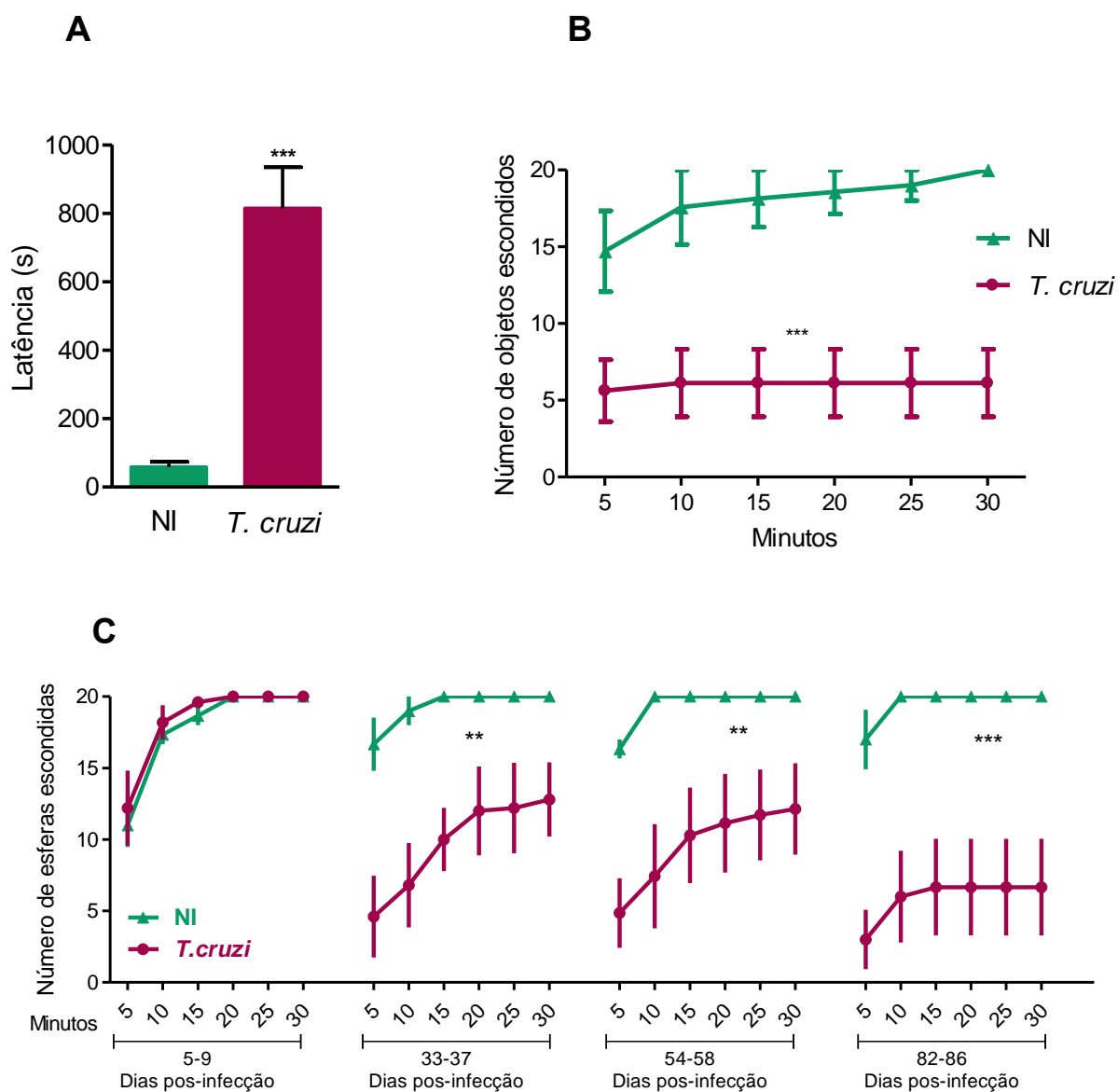


Figura 7.4: Comportamento compulsivo inato em camundongos C57BL/6 durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste de esconder esferas, em comparação a animais não infectados (NI), pareados por idade e sexo. (A) Aumento na latência para esconder as esferas. (B) Diminuição do número de esferas escondidas na fase crônica da infecção (150 dpi). (C) Diminuição do número de esferas escondidas durante o curso da infecção entre 33 a 86 dpi. Análises feitas no período de 30 minutos. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 7-16 camundongos. Dados de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

7.5 Comportamento de ansiedade e alteração locomotora / exploratória estão presentes em camundongos C57BL/6 durante a fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Para avaliar a presença de ansiedade durante a infecção pelo *T. cruzi*, foi utilizado o teste LCE com a análise do número de entradas e a latência do animal nos braços abertos, em sessões de 5 minutos. Nossos resultados mostram que camundongos C57BL/6 em fase crônica (150 dpi) de infecção pelo *T. cruzi* apresentam redução do número de entradas ($p < 0,001$) bem como do tempo de permanência nos braços abertos ($p < 0,001$) (Figura 7.5A) em comparação com os animais NI. Portanto, esses dados suportam a existência de comportamento de ansiedade na infecção experimental crônica pelo *T. cruzi*.

O pressuposto envolvido em estudos de um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade locomotora/exploratória (Berntson et al. 1988; Moscardini et al. 2012). Para avaliar esta alteração, camundongos C57BL/6 foram submetidos ao teste do campo aberto. O número de linhas cruzadas totais e centrais no aparelho foi analisado em sessões de 5 minutos. Camundongos cronicamente infectados (150 dpi) mostraram diminuição no número de linhas cruzadas totais e centrais ($p < 0,001$), quando comparados com animais NI (Figura 7.5B).

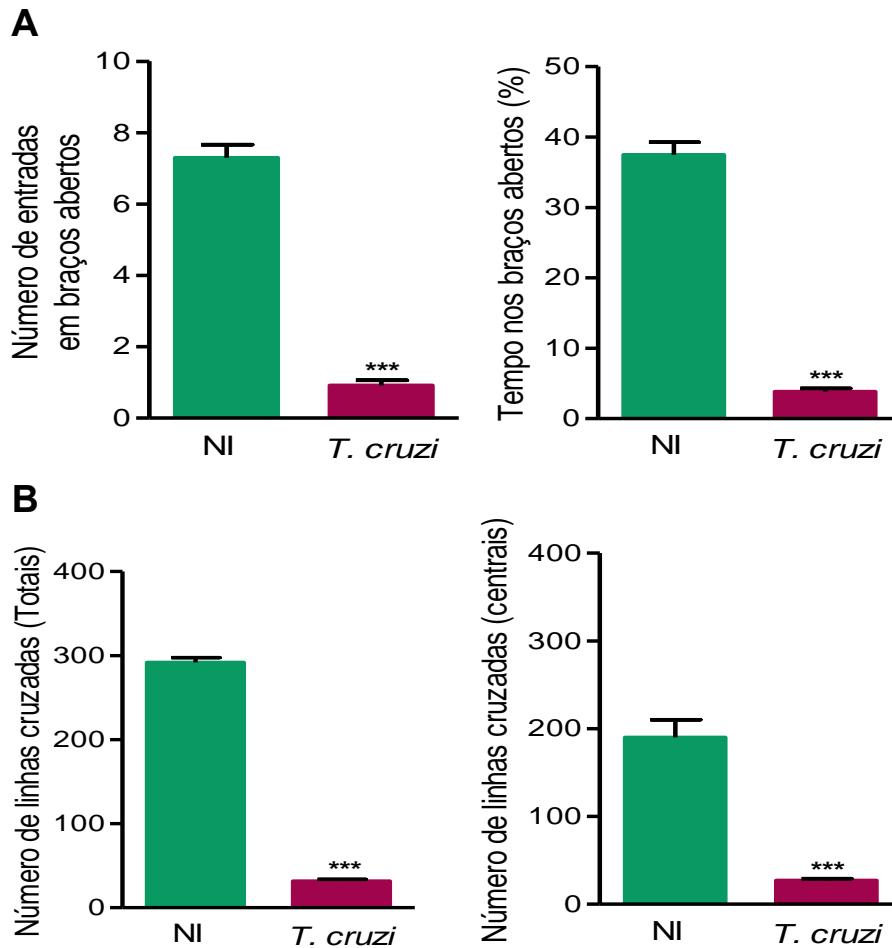


Figura 7.5: Comportamento de ansiedade e alteração locomotora/exploratória em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi) pelo *Trypanosoma cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Os gráficos mostram o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos em sessões de 5 minutos. (A) Redução do número de entradas e do tempo nos braços abertos dos animais infectados, comparados aos seus controles não infectados (NI). (B) Redução do número de linhas cruzadas totais e centrais dos animais infectados dos animais infectados quando comparados aos controles NI. Os dados representam média \pm DP. Os grupos experimentais foram constituídos de 6-15 camundongos por grupo. Figura representativa de três experimentos independentes.
 *** $p < 0,001$.

7.6 Transtornos na coordenação motora, força muscular inalterada e ausência de *sickness behavior* em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

Quando avaliados para coordenação motora pelo RRT, camundongos C57BL/6 na fase crônica mostraram desempenho prejudicado revelado pela redução ($p < 0,001$) da latência para queda no aparelho quando comparados com os animais NI (Figura 7.6A).

Para determinar se a infecção pelo *T. cruzi* é acompanhada por diminuição na força muscular, realizamos GSMT. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na força de preensão muscular dos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção quando foram comparados com animais NI (Figura 7.6B).

Considerando que *sickness behavior* refere-se a um conjunto coordenado de alterações comportamentais que se desenvolvem durante o curso de uma infecção (Dantzer et al. 2009; Maes et al. 2012), analisamos os parâmetros de perda de peso corporal (indicativo de perda de apetite) e aumento da temperatura (indicativo de febre). Em 150 dpi, na observação clínica, não foram detectadas apatia e prostração nos camundongos cronicamente infectados. Além disso, camundongos cronicamente infectados não apresentaram perda de peso corporal, nem alteração na temperatura retal quando comparados com os animais NI pareados por sexo e idade (Figura 7.6C). No seu conjunto, estes dados demonstram que camundongos C57BL/6 infectados com um baixo inóculo da cepa Colombiana não apresentaram sinais de *sickness behavior*.

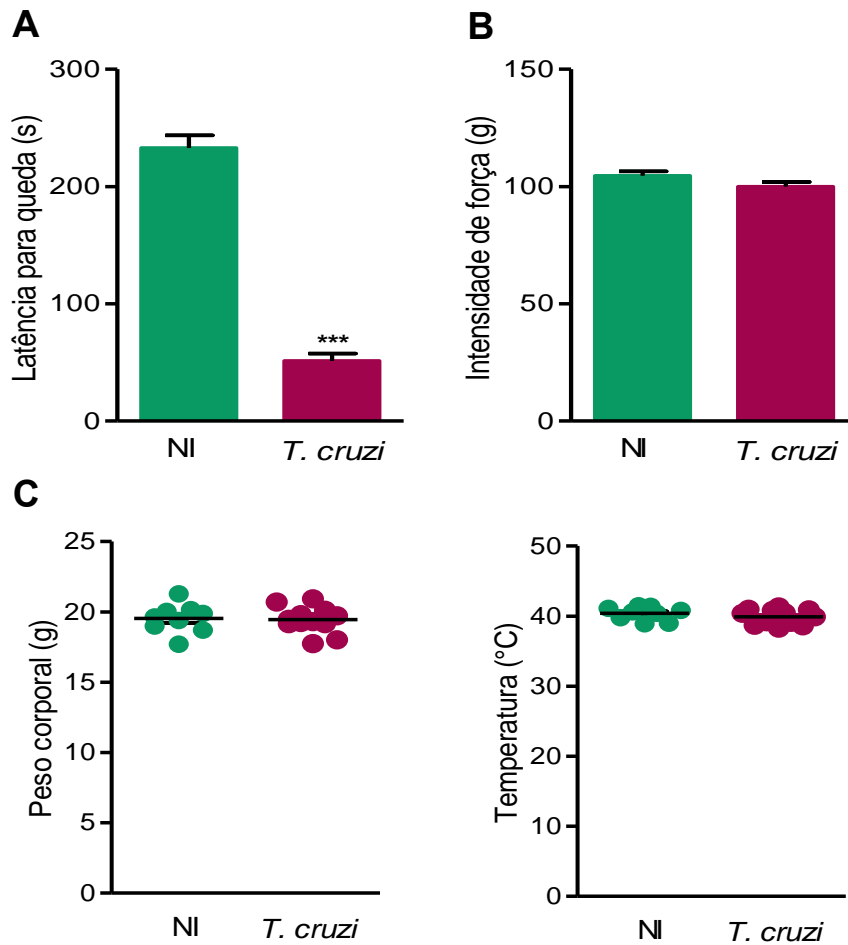


Figura 7.6: Transtorno de coordenação motora, força muscular inalterada e ausência de *sickness behavior* na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*. (A) O gráfico mostra alteração na coordenação motora de animais infectados em comparação com não infectados (NI) no teste rotarod. (B) O gráfico mostra força muscular inalterada de animais infectados em comparação com NI no teste grip strength muscle. (C) Os gráficos mostram ausência de *sickness behavior* nos parâmetros de peso e temperatura, respectivamente. Os animais foram pareados por idade e sexo. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-10 camundongos. Dados de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$

7.7 Avaliação da memória em camundongos da linhagem C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

7.7.1 Ausência de déficit mnemônico no teste de memória aversiva em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

O teste de esquiva inibitória consiste na inibição da exploração do ambiente por meio de choque, utilizado para avaliar a consolidação da memória em camundongos. Considerando que o animal aprende a relacionar a descida da plataforma ao estímulo aversivo (choque), no ensaio observamos que não houve diferença significativa entre animais NI e animais cronicamente infectados (150 dpi) na latência da descida da plataforma no dia do teste. Assim, estes dados indicam que não há déficit mnemônico comparando animais infectados aos animais NI ($p > 0,05$) no tempo de retenção no aparelho (Figura 7.7.1). Portanto, concluímos que a infecção pelo *T. cruzi*, não promoveu prejuízo na memória aversiva.

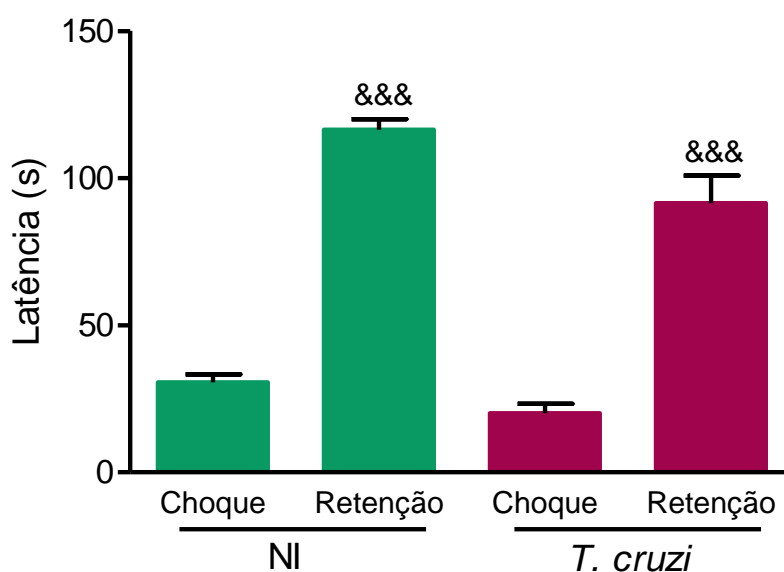


Figura 7.7.1: Ausência de déficit na memória aversiva observada em camundongos C57BL/6 durante a fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Os gráficos indicam a latência, o tempo de descida da plataforma no dia do treino (choque) e no dia do teste de retenção da memória. Não houve diferença significativa entre os tempos de latência na retenção dos animais não infectados (NI) em relação aos animais infectados em 150 dpi. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-10 camundongos. Dados de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$, comparação entre choque e retenção.

7.7.2 Infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* induz déficit mnemônico no teste de memória de habituação em camundongos C57BL/6

A habituação a um novo ambiente é uma das tarefas de aprendizagem não associativa e não aversiva. A exposição repetida a um novo ambiente resulta em redução do comportamento exploratório, que pode ser tomado como parâmetro de memória de habituação. Os animais NI diminuíram a atividade exploratória, observado na redução do número de linhas cruzadas no campo aberto ($p < 0,001$) no dia do teste (dia 2). Por outro lado, os animais cronicamente infectados (150 dpi) não diminuíram a atividade exploratória na sessão teste (dia 2), suficiente para ser significativo em relação à sessão treino (dia 1), o que pode indicar prejuízo da memória de habituação (Figura 7.7.2A). Também, observamos que o déficit mnemônico nos animais infectados não foi detectado no início da fase aguda (5-9 dpi), mas já foi percebido mais tarde na fase aguda da infecção (33-37 dpi) (Figura 7.7.2B).

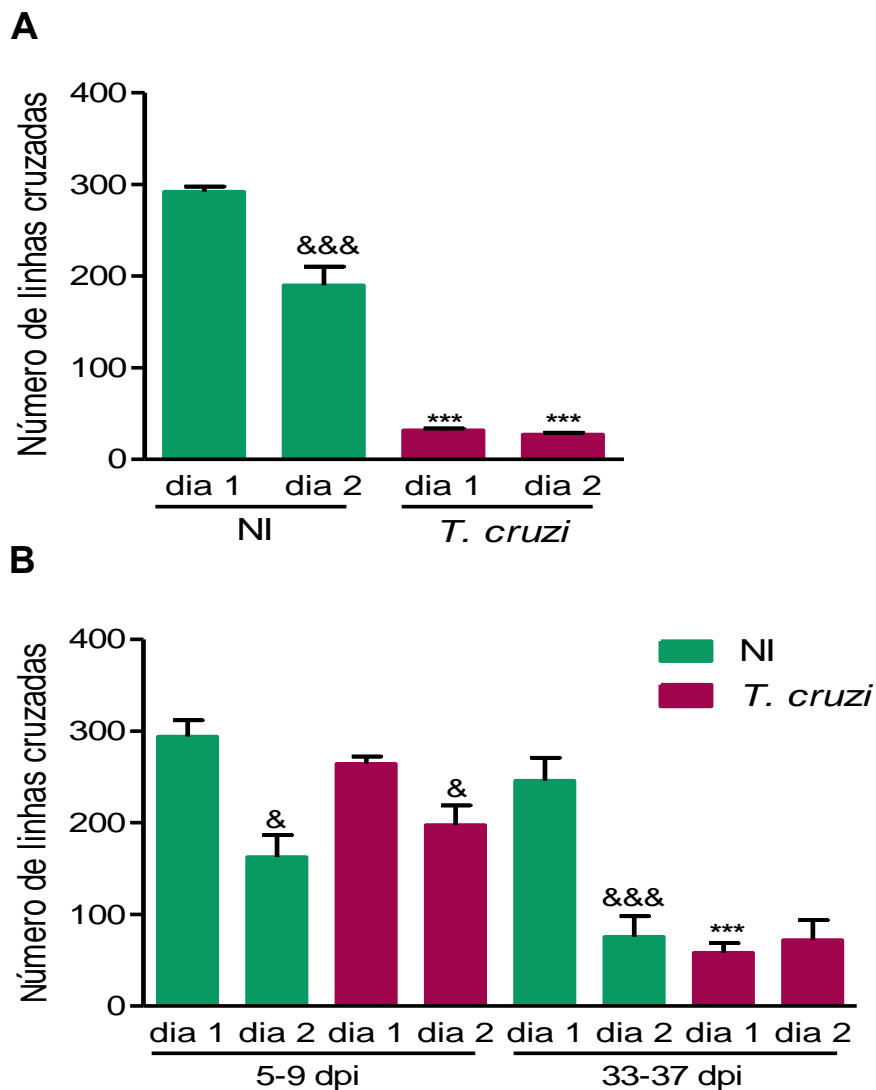


Figura 7.7.2: Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* induz déficit mnemônico em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste campo aberto para avaliação de memória de habituação. Os gráficos indicam o número de linhas cruzadas no 1º dia (treino) e 2º dia (teste), pelo período de 5 minutos. (A) Animais não infectados (NI) diminuíram o nº de linhas cruzadas no dia do teste, porém essa diferença não foi observada nos animais infectados pelo *T. cruzi*, indicando déficit mnemônico. (B) Alterações neste parâmetro são observadas entre 33-37 dpi. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 3-10 camundongos. Dados de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ comparando NI com *T. cruzi*; & $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$ em comparação dia 1 com dia 2 de teste intragrupos.

7.7.3 Déficit mnemônico no teste de reconhecimento de objetos em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

O teste de reconhecimento de objetos consiste em analisar a tendência natural do animal em explorar o ambiente e discriminar o objeto novo. Roedores possuem uma tendência natural para gastar mais tempo explorando novos objetos que aqueles conhecidos, sendo esta referência utilizada como parâmetro de memória de reconhecimento de objetos. A análise feita sobre o tempo de exploração do objeto novo nos camundongos da linhagem C57BL/6 mostrou que nos animais cronicamente (150 dpi) infectados pelo *T. cruzi* este tempo não difere do tempo gasto na exploração do objeto familiar, indicando prejuízo mnemônico na habilidade de reconhecer um novo objeto quando comparados aos animais NI (Figura 7.7.3A). Ressalta-se que as alterações neste parâmetro não são detectadas no início da fase aguda (5-9 dpi), mas já são observadas em momento mais avançado na fase aguda da infecção (33-37 dpi) (Figura 7.7.3B).

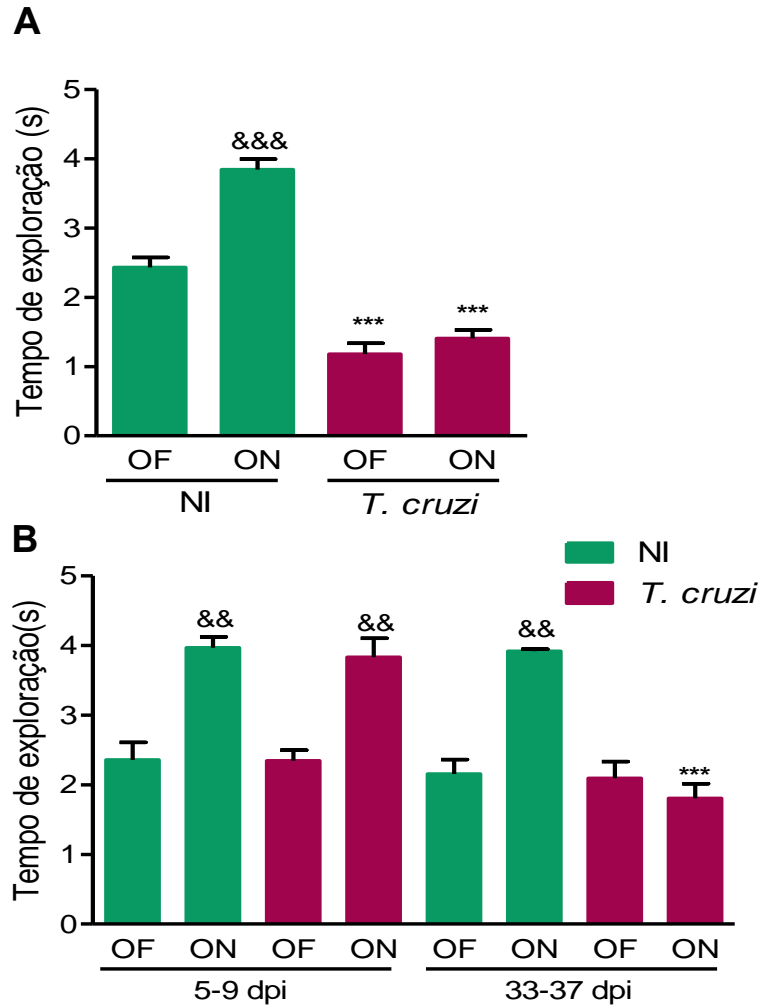


Figura 7.7.3: Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* induz déficit mnemônico da memória de reconhecimento em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste campo aberto para avaliação de memória de reconhecimento. Os gráficos indicam o tempo de exploração (em segundos) do objeto familiar e do objeto novo, pelo período de 5 minutos. (A) Animais não infectados (NI) aumentaram o tempo de exploração do objeto novo, porém essa diferença não foi observada nos animais infectados pelo *T. cruzi* indicando déficit mnemônico. (B) Alterações neste parâmetro foram observadas entre 33-37 dpi. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 4-10 camundongos. Dados de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ comparando NI com *T. cruzi*; && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ comparação entre OF e ON intragrupos.

7.8 Intervenção com o antidepressivo Fluoxetina em camundongos C57BL/6 na infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*

Diante dos resultados obtidos no TST e FST indicando a indução de depressão nos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, investigamos se os animais possuíam perfil depressivo. Para tal, buscamos interferir no perfil depressivo desenvolvido durante a infecção crônica com uma droga terapêutica utilizada na depressão em humanos e animais (Caiaffo et al. 2016).

7.8.1 Tratamento com Fluoxetina melhora anormalidades no eletrocardiograma em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

Os registros de ECG em 150 dpi mostram que animais cronicamente infectados e submetidos à terapia com Fx apresentaram redução da frequência de animais com de ART ($p < 0,01$), comparados aos que receberam salina. Nos animais tratados com Fx também se observou redução do número de animais com BAV2 registrados em intervalos de 2 minutos, quando comparados aos animais que receberam salina (Figura 7.8.1 A-B). Além disso, animais infectados pelo *T. cruzi*, que receberam o tratamento com Fx, apresentaram efeito benéfico em relação à frequência cardíaca quando comparados aos animais que receberam salina e aos animais NI (Figura 7.8.1C). A terapia com Fx nos animais infectados, resultou na redução do prolongamento do intervalo PR ($p < 0,05$) quando comparados aos animais que receberam salina. (Figura 7.8.1C). Em relação ao intervalo QTc nos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, que receberam Fx, não observamos efeito significativo no prolongamento do intervalo QTc quando comparados com os animais que receberam salina.

No seu conjunto, estes resultados mostram que a terapia com Fx foi favorável nas alterações cardíacas na fase crônica pelo *T. cruzi*.

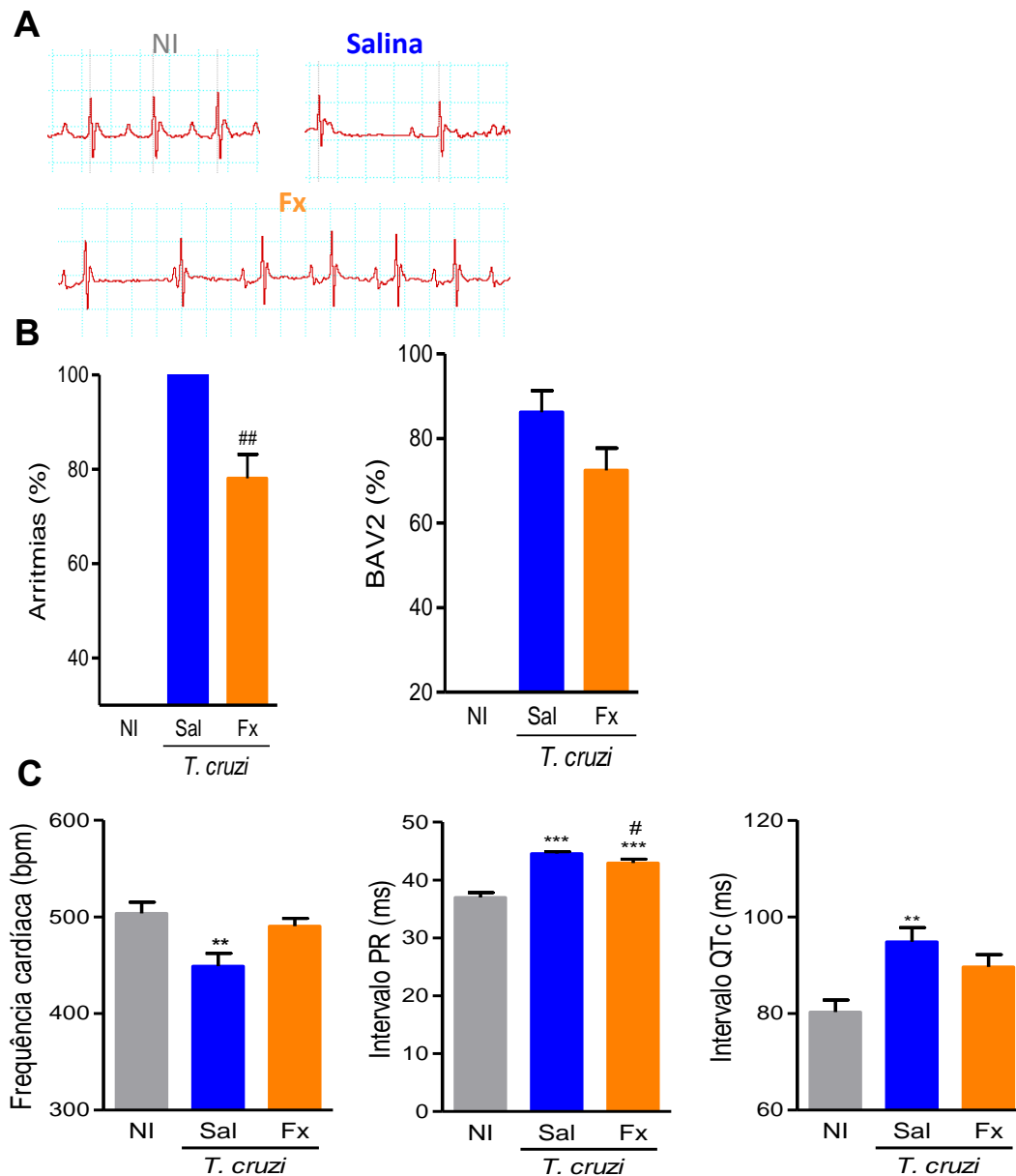


Figura 7.8.1: A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* induz alterações eletrocardiográficas (ECG) durante a fase crônica da infecção (150 dpi). (A) Segmentos representativos do registro do ECG de animais infectados em comparação com não infectados (NI), pareados por idade e sexo. (B) Resumo dos dados dos grupos para a frequência dos animais que apresentam arritmias e bloqueio atrioventricular de segundo grau. (C) Os gráficos indicam os registros de ECG mostrando batimentos cardíacos, duração (ms) do intervalo PR e do intervalo QTc. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando NI com *T. cruzi* + salina e NI com *T. cruzi* + Fx; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + Fx.

7.8.2 Intervenção terapêutica com Fluoxetina reverte o comportamento depressivo e melhora o comportamento de ansiedade nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção

Animais infectados C57BL/6 tratados com Fx apresentaram tempo de imobilidade menor ($p < 0,001$), quando comparados aos animais infectados que receberam salina (Figura 7.8.2A). Com relação ao comportamento de ansiedade, após o tratamento dos animais infectados com Fx, observou-se aumento do número de entradas ($p < 0,01$) e latência ($p < 0,001$) nos braços abertos do labirinto, quando comparados com animais infectados tratados com salina, ainda que apresentem alterações quando comparados com animais NI de mesma idade e sexo (Figura 7.8.2B).

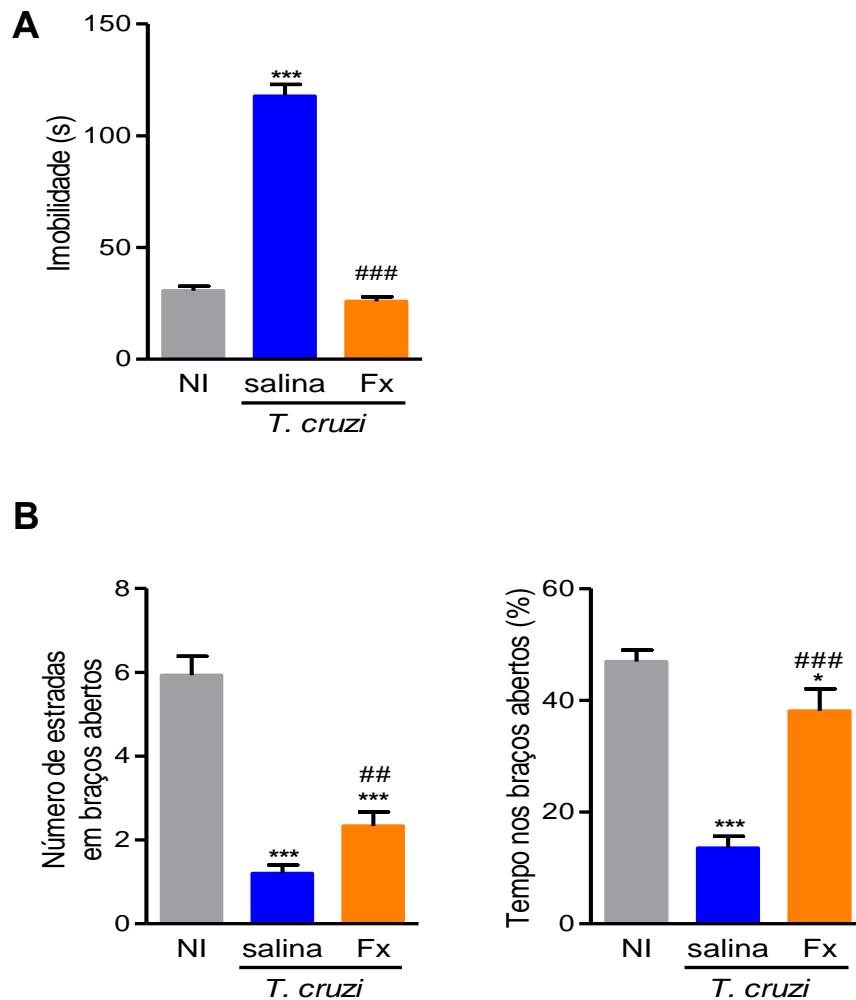


Figura 7.8.2: Comportamento depressivo induzido pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é revertido e comportamento de ansiedade melhorado com a intervenção terapêutica com Fluoxetina (Fx) em camundongos C57BL/6 na fase crônica (150 dpi). Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*, tratados por 30 dias consecutivos (120-150 dpi) e submetidos aos testes TST e LCE. (A) O gráfico indica o tempo de imobilidade (em segundos) no TST, em período de 5 minutos. O tempo de imobilidade diminuiu nos animais infectados e tratados com Fx quando comparados aos animais infectados que receberam salina. (B) O tratamento com Fx aumentou o número de entradas e o tempo nos braços abertos quando comparado aos animais tratados com salina. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparando NI com *T. cruzi* + salina e *T. cruzi* + Fx; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + Fx.

7.8.3 Comportamento compulsivo inato é restaurado e alteração locomotora/exploratória é melhorada pela intervenção terapêutica com Fluoxetina em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Nossos resultados indicam que em sessões de 30 minutos no teste de esconder esferas os animais infectados que receberam a terapia com Fx restauraram o comportamento espontâneo de enterrar materiais aversivos presentes em seu ambiente, com padrão semelhante aos animais NI, quando comparados aos animais infectados que receberam salina ($p < 0,001$) (Figura 7.8.3A).

Atividade exploratória e locomotora foi analisada usando o teste do campo aberto. A tendência natural do animal em um ambiente novo é de explorá-lo. O tratamento com Fx, nos animais cronicamente infectados (150 dpi), resultou em efeito benéfico expresso em números aumentados ($p < 0,001$) de linhas totais cruzadas no aparelho quando comparados com os animais infectados que receberam salina (Figura 7.8.3B).

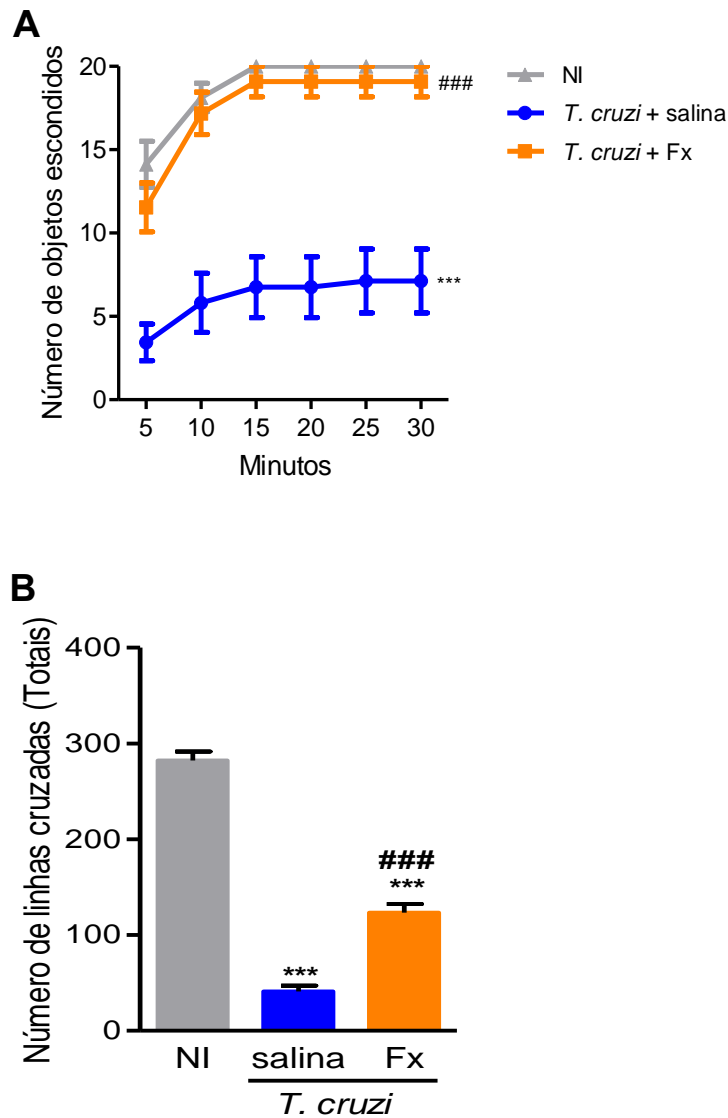


Figura 7.8.3: Comportamento compulsivo inato e de ansiedade em camundongos C57BL/6 durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste de esconder esferas. A latência e a quantificação do número de esferas escondidas foram analisadas no período de 30 minutos. (A) O número de esferas escondidas aumentou nos animais infectados e tratados com Fx quando comparados aos animais infectados que receberam salina. (B) O tratamento com Fx aumentou o número de linhas totais cruzadas quando comparado aos animais tratados com salina. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dados de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$, comparando NI com *T. cruzi* + salina e *T. cruzi* + Fx; ### $p < 0,001$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + Fx.

7.8.4 Intervenção terapêutica com Fluoxetina propicia efeito benéfico na memória de habituação e de reconhecimento de objetos nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Na avaliação da memória aversiva utilizamos o teste de esQUIVA passiva, no qual consideramos a latência de descida da plataforma da sessão de retenção como parâmetro de memória. Camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi) reconheceram e responderam à memória do estímulo aversivo, com aumento na latência ($p < 0,001$) no dia de retenção em relação ao dia do choque, de modo semelhante entre os animais NI e animais que receberam salina (Figura 7.8.4A). Assim, nossos resultados, mostraram que a terapia com Fx não teve nenhuma ação direta sobre a memória aversiva.

Com relação ao teste de memória de habituação, o tratamento com Fx nos animais cronicamente infectados (150 dpi) contribuiu para um efeito benéfico na memória expresso na diminuição ($p < 0,05$) do número de linhas cruzadas no campo aberto no dia do teste (dia 2), quando comparado ao dia do treinamento (dia 1) e aos animais que receberam salina (Figura 7.8.4B).

Além disso, no teste de memória de reconhecimento de objetos, animais que receberam a intervenção terapêutica com Fx, apresentaram aumento ($p < 0,001$) do tempo de exploração do objeto novo, quando comparados com animais infectados tratados com salina, indicando melhora do déficit mnemônico. A razão de discriminação dos objetos foi estabelecida pelo tempo gasto em explorar o objeto novo dividido pela soma dos tempos gastos para explorar o objeto novo e o familiar (Figura 7.8.4C).

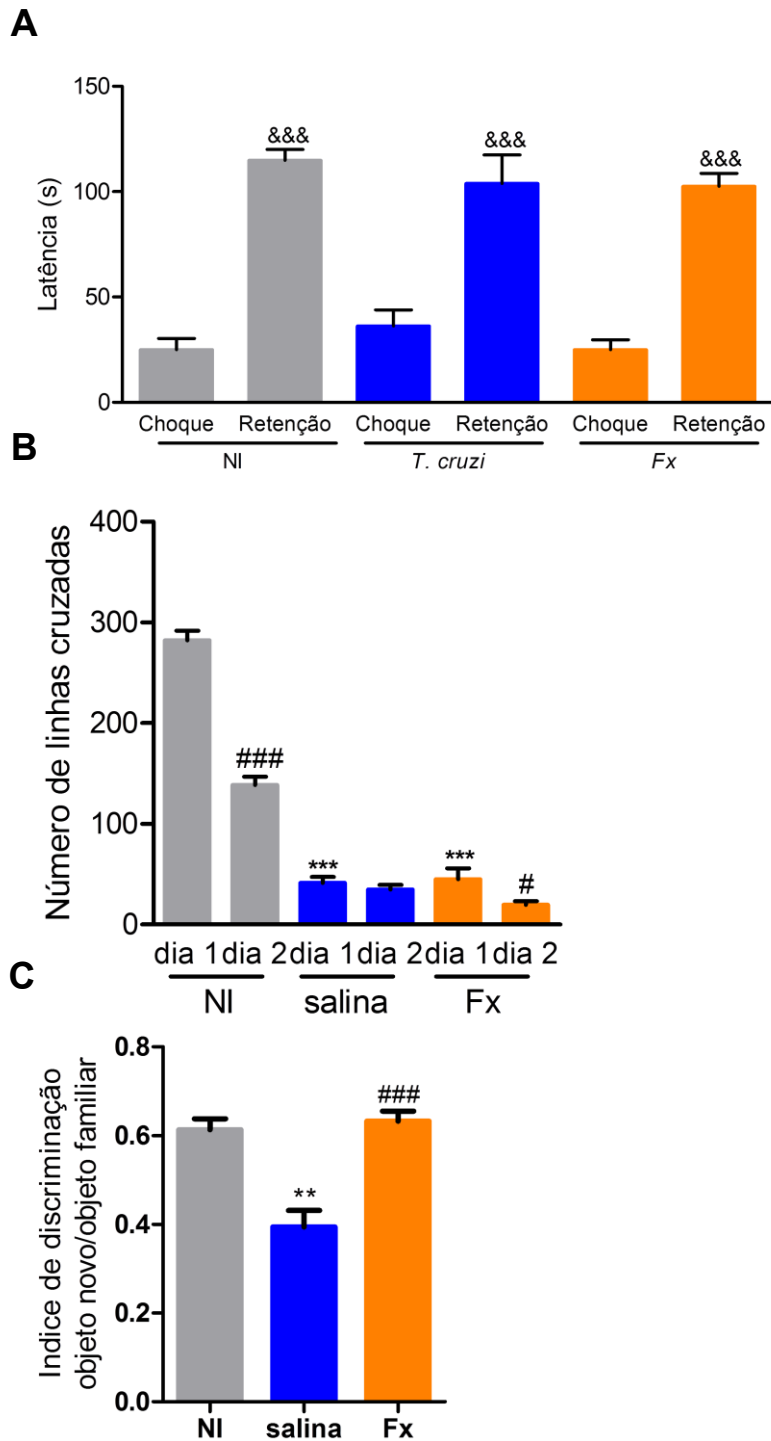


Figura 7.8.4: Intervenção terapêutica com Fx melhora déficit mnemonico em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste campo aberto para avaliação da memória. (A) O gráfico indica que a infecção pelo *T. cruzi* e a terapia com Fx não prejudicou a memória aversiva. (B-C) Animais infectados e tratados com Fx aumentaram o tempo de exploração do ambiente no dia do teste (B) e o tempo de exploração do objeto novo (C). Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dados de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, comparando NI com *T. cruzi* + salina e *T. cruzi* + Fx; ### $p < 0,001$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + Fx & $p < 0,05$ && $p < 0,05$ comparação intragrupos.

7.9 Intervenções terapêutica com as drogas tripanossomicida Benznidazol, medicamento imunorregulador Pentoxifilina e a combinação de ambas as terapias

7.9.1 Intervenções terapêuticas reduzem a carga parasitária nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

O delineamento experimental mostra que camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. A partir de 120 dpi, os animais foram diariamente tratados com dose sub-ótima de Bz, PTX e da combinação dos medicamentos (Bz+PTX) durante 30 dias. Salina foi utilizada para diluição de Bz, PTX e como veículo controle (Figura 7.9.1A).

Inicialmente, analisamos o impacto destes esquemas terapêuticos sobre parasitemia e parasitismo cardíaco. Em 150 dpi, o tratamento com PTX não alterou o número de parasitos circulantes quando comparados aos animais infectados e injetados com salina. Contudo, animais infectados e tratados com Bz ($p < 0,05$) ou Bz+PTX ($p < 0,01$), a parasitemia foi reduzida (Figura 7.9.1B). Além disso, animais infectados que receberam a terapia com PTX não apresentaram parasitismo cardíaco alterado quando comparados aos animais injetados com salina. No entanto, após terapia com Bz ($p < 0,01$) ou Bz+PTX ($p < 0,05$) a carga parasitária no coração foi reduzida nos animais infectados. Por outro lado, nossos dados mostram redução do parasitismo no SNC com as terapias Bz, PTX, BZ+PTX. (Figura 7.9.1B) nas áreas de hipocampo e córtex cerebral.

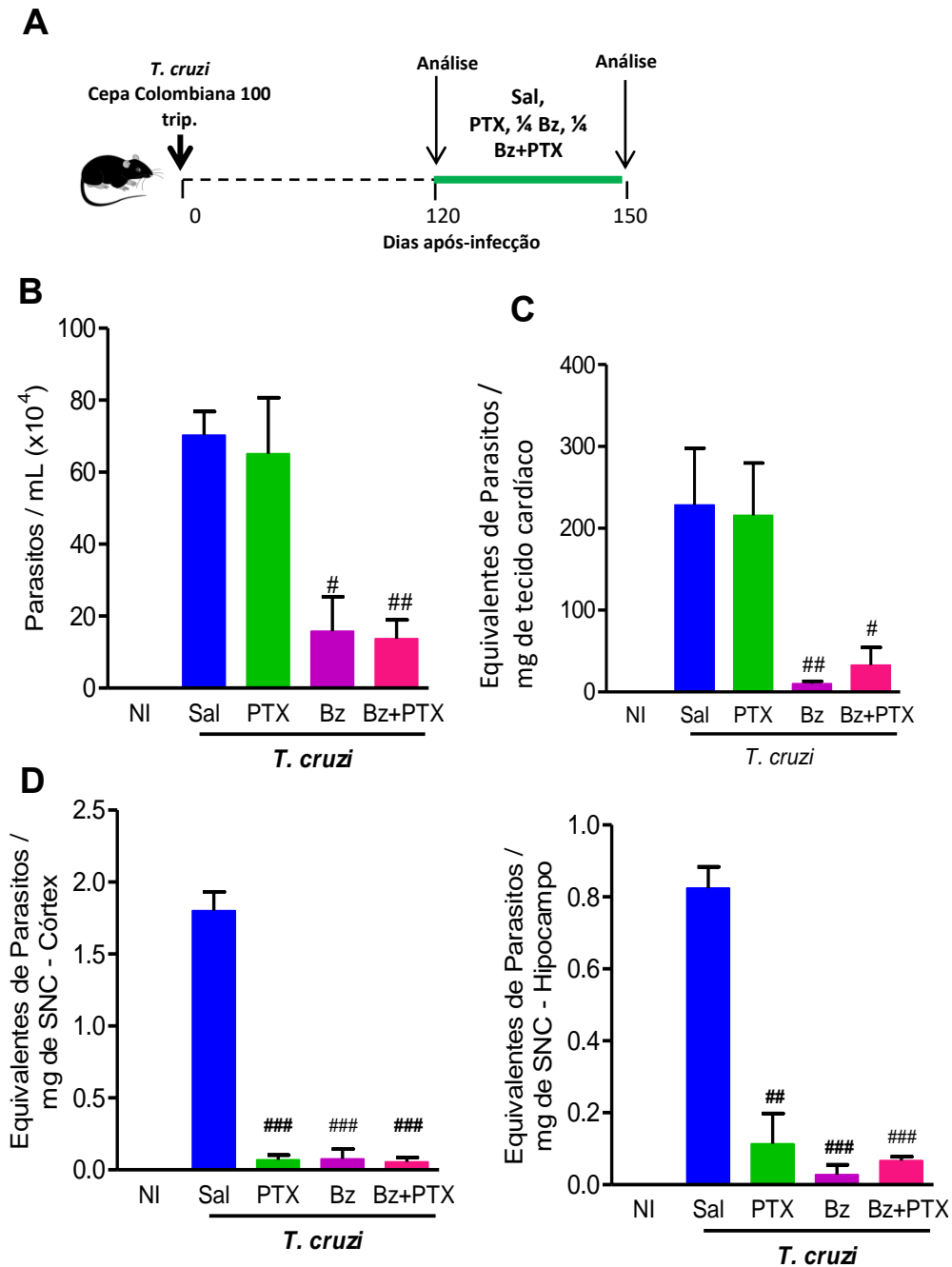


Figura 7.9.1: Intervenções terapêuticas reduzem a carga parasitária nos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. (A) Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *T. cruzi* foram tratados diariamente (120 a 150 dpi) com salina, PTX, dose sub-ótima de Bz ou com terapia combinada (Bz+PTX) e analisada em 150 dpi, comparados a animais não infectados (NI) pareados por idade e sexo. (B) O gráfico mostra níveis de parasitemia (C) Parasitismo cardíaco. (D) Parasitismo cerebral nas áreas de córtex e hipocampo, respectivamente. Em cada experimento, os grupos foram constituídos de 3-6 camundongos. [#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$, ^{###} $p < 0,001$ comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

7.9.2 Terapia combinada restaura intervalos normais de QTc no ECG dos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Os registros de ECG mostram que animais cronicamente infectados e injetados com salina apresentaram alterações elétricas como ART, BAV2, bradicardia e intervalos PR e QTc prolongados (Figura 7.9.2A-C). Não foram observadas anormalidades elétricas nos animais NI pareados por idade e sexo, na análise feita em paralelo com animais infectados pelo *T. cruzi*. Os três esquemas terapêuticos (Bz, PTX e Bz+PTX) foram benéficos quanto a alterações elétricas registradas nos traçados eletrocardiográficos, em intervalos de 2 minutos (Figura 7.9.2A).

Todos os animais infectados e injetados com salina apresentaram ART, enquanto nos grupos de animais tratados com PTX ($p < 0,05$), Bz ($p < 0,001$), e BZ+PTX ($p < 0,01$) observamos redução do percentual de animais com ART quando comparados aos animais que receberam salina (Figura 7.9.2B). Além disso, os três esquemas terapêuticos resultaram em redução ($p < 0,001$) da frequência de animais com BAV2.

A análise da frequência cardíaca (batimentos por minuto) mostrou que, em comparação com animais NI, animais infectados que receberam salina apresentaram frequência cardíaca baixa ($p < 0,01$). O tratamento com PTX não teve efeito significativo ($p > 0,05$) na bradicardia, porém, os esquemas terapêuticos usando Bz ($p < 0,05$) e Bz+PTX ($p < 0,05$) aumentaram o número de batimentos cardíacos. Além disso, comparados aos animais infectados que receberam salina, os animais submetidos aos esquemas terapêuticos com PTX ($p < 0,01$), Bz ($p < 0,001$) ou Bz+PTX ($p < 0,001$) apresentaram redução do prolongamento do intervalo PR. Em relação ao prolongamento do intervalo QTc nos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, não observamos efeito do tratamento com Bz ($p > 0,05$). No entanto, nos animais que recebem a terapia com PTX ($p < 0,05$) detectamos diminuição do prolongamento do intervalo QTc detectado nos animais infectados e tratados com salina. Já nos animais que receberam a terapia combinada Bz+PTX ($p < 0,01$), o prolongamento do intervalo QTc foi revertido aos valores de normalidade detectados em animais NI de igual idade e sexo (Figura 7.9.2C).

Assim, na análise do ECG mostramos que a terapia Bz+PTX foi a mais favorável comparada aos outros esquemas terapêuticos utilizados (Bz ou PTX) na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*.

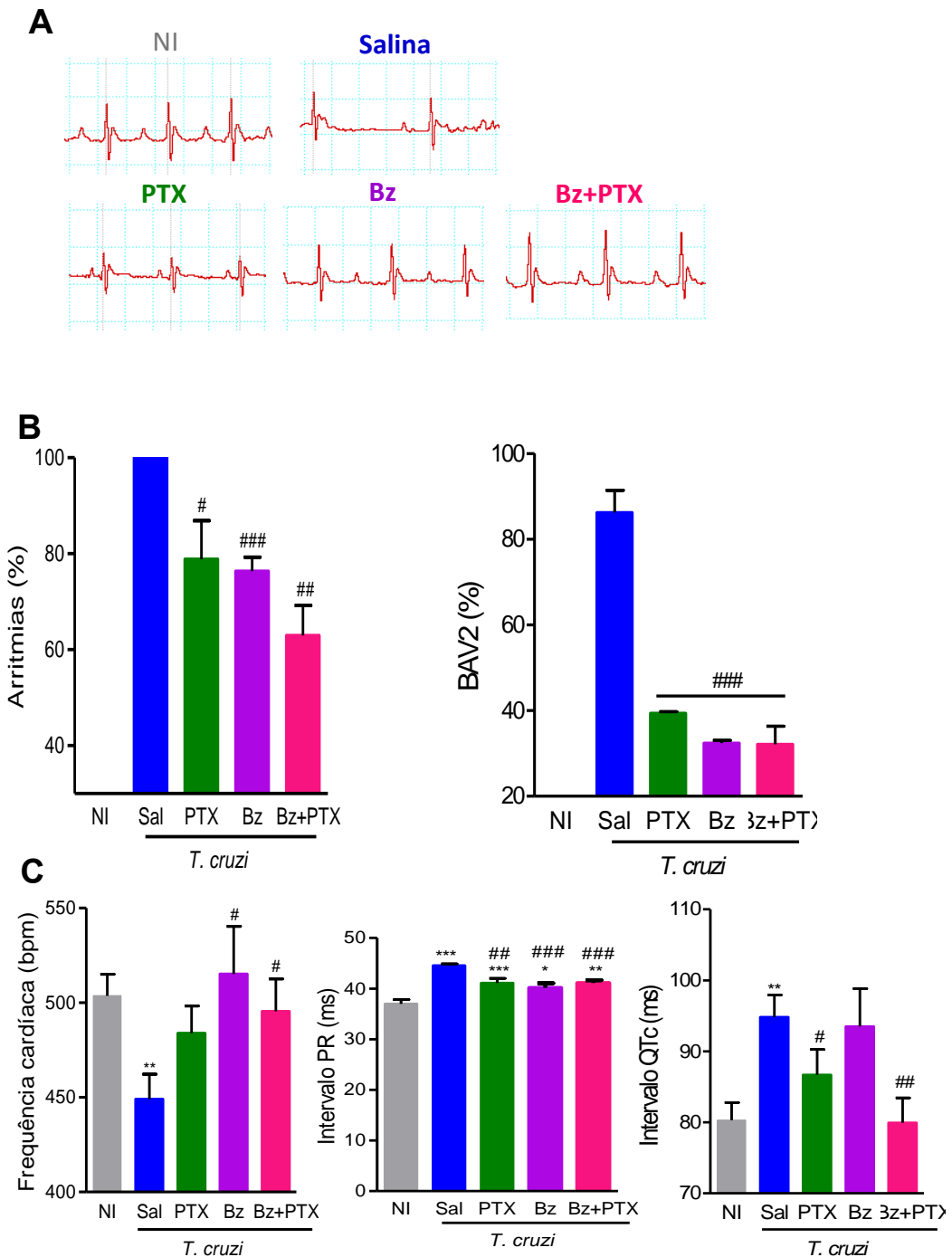


Figura 7.9.2: Terapias tripanossomícida, imunorreguladora ou combinada restauram ou melhoram alterações eletrocardiográficas (ECG) durante a fase crônica da infecção (150 dpi). (A) Segmentos representativos do registro do ECG de animais infectados em comparação com não infectados (NI) pareados por idade e sexo. (B) Resumo dos dados dos grupos para a frequência dos animais que apresentam arritmias (ART) e bloqueio atrioventricular de segundo grau (BAV2). (C) Os gráficos indicam os registros de ECG mostrando frequência cardíaca em batimentos cardíacos por minuto (bpm), duração (ms) do intervalo PR e do intervalo QTc. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando NI com *T. cruzi* + salina e NI com *T. cruzi* + terapias; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

7.9.3 Intervenção terapêutica reverte comportamento depressivo e favorece melhora no comportamento de ansiedade em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Para investigar a influência das terapias no comportamento depressivo submetemos os animais ao TST. Em 150 dpi, animais infectados que receberam salina apresentaram aumento ($p < 0,001$) no tempo de imobilidade quando comparados aos animais NI, corroborando resultados anteriores (Vilar-Pereira et al. 2012). No entanto, em animais infectados os tratamentos com PTX ($p < 0,001$), Bz ($p < 0,001$) ou Bz+PTX ($p < 0,001$) reverteram completamente o comportamento depressivo, expresso no tempo de imobilidade menor quando comparados aos animais infectados que receberam salina e semelhantes aos valores de normalidade com animais NI (Figura 7.9.3A).

Em relação ao comportamento de ansiedade, analisado no teste do labirinto em cruz elevado, animais que receberam as terapias PTX ($p < 0,01$), Bz ($p < 0,05$) e Bz+PTX ($p < 0,05$) mostraram melhora no parâmetro do número de entradas nos braços abertos, da mesma forma que no parâmetro da latência nos braços abertos PTX ($p < 0,01$), Bz ($p < 0,05$); Bz+PTX ($p < 0,05$) (Figura 7.9.3B).

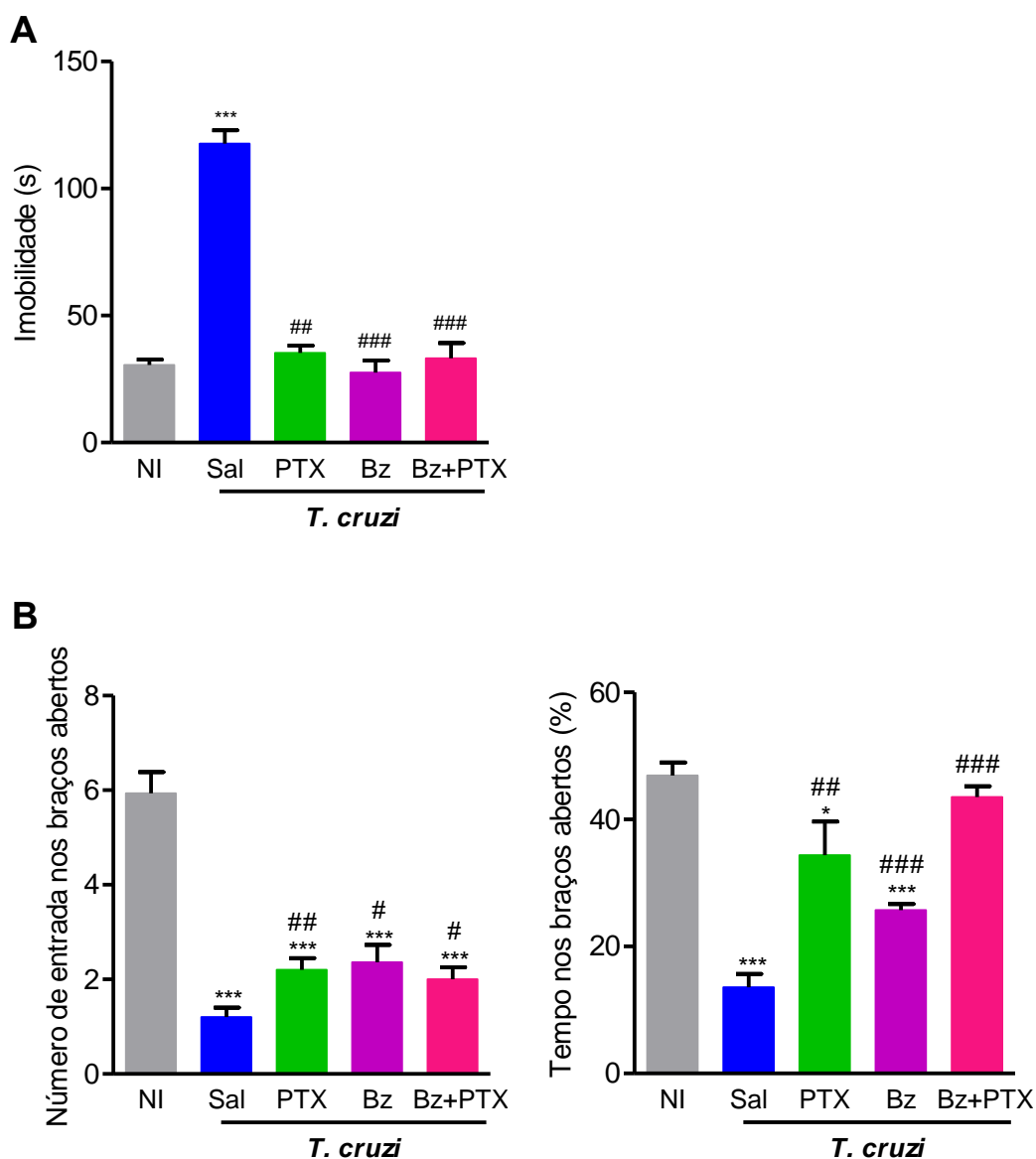


Figura 7.9.3: Intervenções terapêuticas revertem comportamento depressivo induzido pelo *Trypanosoma cruzi* e melhora comportamento de ansiedade em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*, tratados por 30 dias consecutivos (120-150 dpi) e submetidos aos testes TST e LCE. (A) O gráfico indica o tempo de imobilidade no TST, em período de 5 minutos. O tempo de imobilidade diminuiu nos animais infectados e tratados com PTX, Bz ou PTX+Bz, quando comparados aos animais infectados que recebeu salina. (B) O tratamento com as terapias PTX, Bz ou PTX+Bz aumentou o número de entradas e o tempo nos braços abertos, quando comparado aos animais tratados com salina. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dado representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparando NI com *T. cruzi* + salina e *T. cruzi* + terapias; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

7.9.4 Esquema terapêutico recupera o comportamento compulsivo inato e reduz alterações locomotoras / exploratórias em camundongos C57BL/6, na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Em 150 dpi, após terapia com PTX ($p < 0,001$), Bz ($p < 0,001$) ou Bz+PTX ($p < 0,001$), nos animais cronicamente infectados foi restaurado o comportamento espontâneo de enterrar materiais aversivos presentes em seu ambiente, quando comparados aos animais infectados que receberam salina e semelhante aos animais NI (Figura 7.9.4A). Ainda, as intervenções terapêuticas com PTX ($p < 0,01$), Bz ($p < 0,001$) ou Bz+PTX ($p < 0,001$) reduziram as alterações locomotoras/exploratórias nos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* quando comparados aos animais infectados que receberam salina (Figura 7.9.4B).

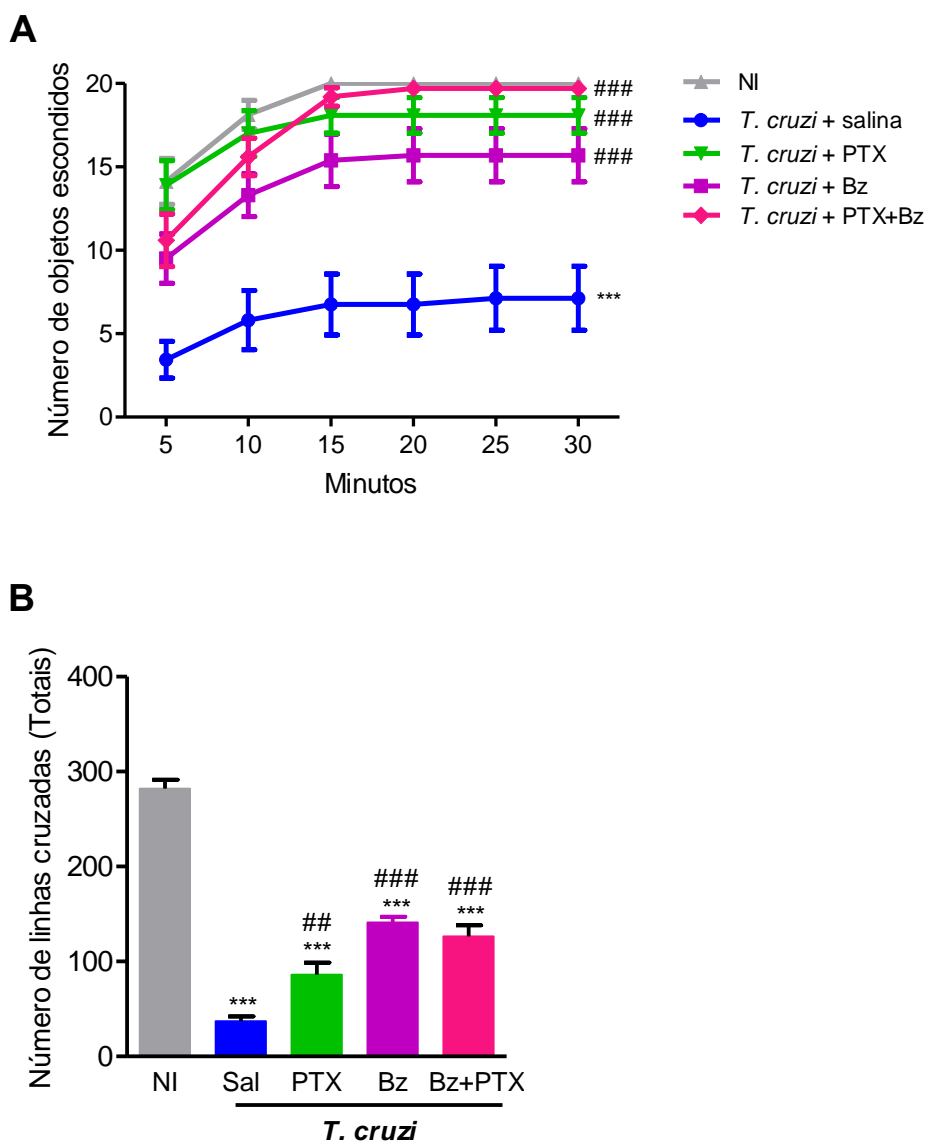


Figura 7.9.4: Intervenções terapêuticas recuperam comportamento compulsivo inato e melhoram comportamento de ansiedade em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste de esconder esferas. A latência e a quantificação do número de esferas escondidas foram analisadas no período de 30 minutos. (A) Aumento do número de esferas escondidas na fase crônica da infecção (150 dpi) dos animais que recebem as terapias comparando com animais infectados que receberam salina (B) Diminuição do número de linhas cruzadas pelos animais que receberam as intervenções terapêuticas em relação aos animais infectados tratados com salina (150 dpi). Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dado representativo de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$, comparando NI com *T. cruzi* + salina e *T. cruzi* + terapias; ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

7.9.5 Intervenções terapêuticas foram benéficas no déficit mnemônico em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

No teste de memória aversiva, a latência de descida da plataforma da sessão de retenção foi o parâmetro analisado no desempenho da memória. Não observamos alteração de memória aversiva nos animais infectados, comparados com animais NI, pareados por idade e sexo. Os animais infectados que receberam as terapias PTX, Bz e Bz+PTX, reconheceram e responderam à memória do estímulo aversivo, com aumento na latência ($p < 0,001$) no dia de retenção em relação ao dia do choque, de modo semelhante aos animais NI (Figura 7.9.5A), indicando que as terapias não interferiram na geração da memória aversiva. No entanto, na análise da memória de habituação em camundongos cronicamente infectados observamos efeito benéfico do tratamento com PTX ($p < 0,05$), Bz ($p < 0,001$) ou Bz+PTX ($p < 0,05$) no déficit mnemônico, demonstrado na diminuição do número de linhas cruzadas no dia do teste, quando comparados a animais infectados que receberam salina (Figura 7.9.5B).

Nossos resultados mostraram também, que animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* após os tratamentos com PTX ($p > 0,01$), Bz ($p > 0,01$) ou Bz+PTX ($p > 0,01$) apresentaram aumento do tempo de exploração do objeto novo, quando comparados com animais infectados tratados com salina, indicando melhora do déficit mnemônico. A razão de discriminação dos objetos foi estabelecida pelo tempo gasto em explorar o objeto novo dividido pela soma dos tempos gastos para explorar o objeto novo e o familiar (Figura 7.9.5C).

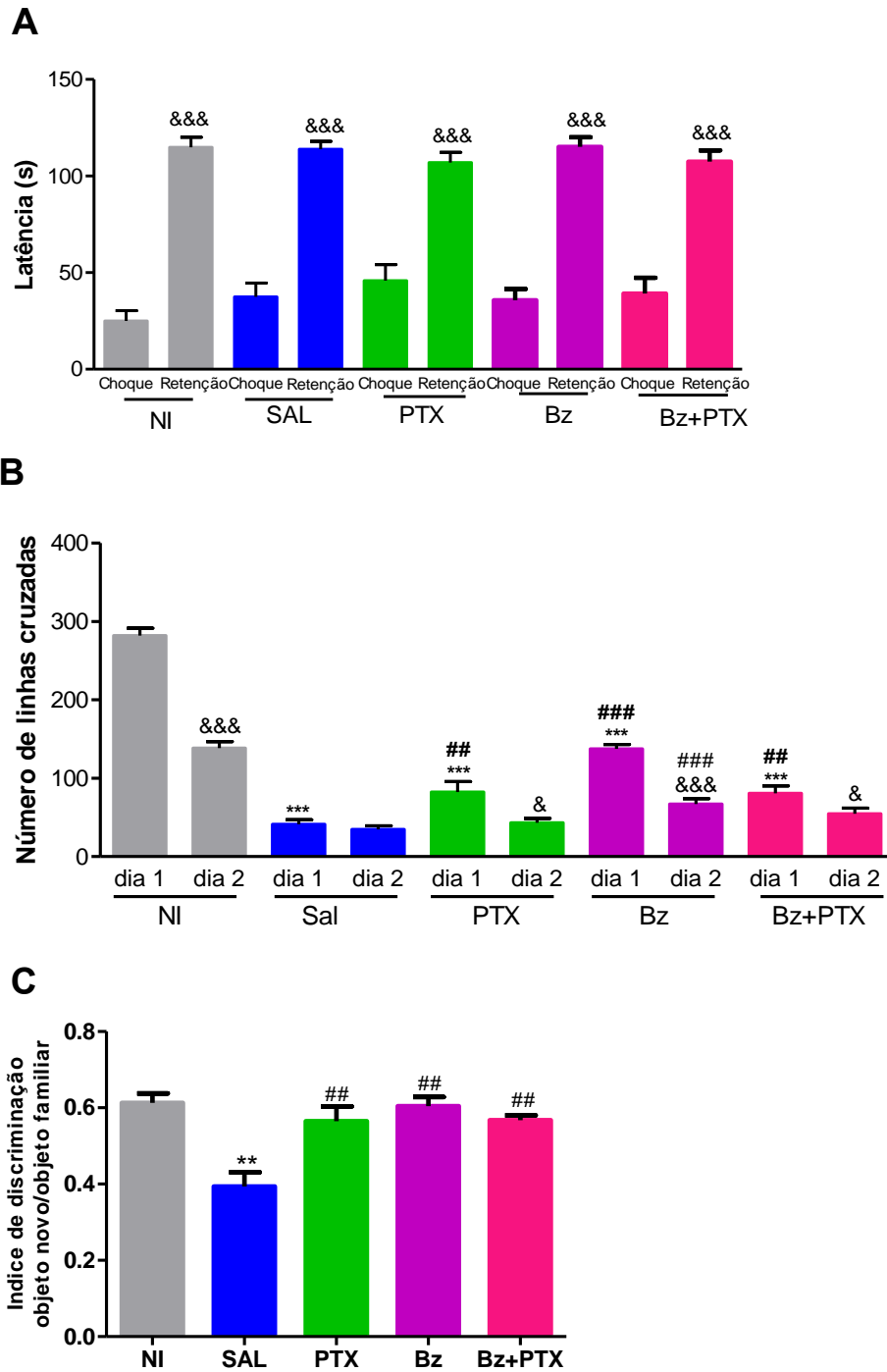


Figura 7.9.5: Intervenções terapêuticas melhoram déficit mnemônico no teste de habituação em camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). Animais foram infectados com 100 formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* e submetidos ao teste campo aberto para avaliação da memória. (A) O gráfico indica que a infecção pelo *T. cruzi* e as terapias não interferiram na formação da memória aversiva, que é preservada em animais cronicamente infectados. (B) Animais infectados e tratados com PTX, Bz ou PTX+Bz mostraram diminuição do tempo de exploração do ambiente no dia do teste. (C) Intervenções terapêuticas tiveram efeito no tempo de exploração do objeto novo (ON) em relação ao objeto familiar (OF). Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dado representativo de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparando NI com *T. cruzi* + salina e *T. cruzi* + terapias; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias, & $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$ comparação intragrupos.

7.9.6 Estresse oxidativo presente em animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* é reduzido pelas terapias propostas

Procurando trazer informações mecanísticas para os achados em relação às alterações comportamentais e o efeito benéfico das terapias propostas, avaliamos o efeito da infecção pelo *T. cruzi* sobre o parâmetro de estresse oxidativo avaliado pela detecção de níveis de malondialdeído em córtex e hipocampo de camundongos C57BL/6, usando a detecção por TBARS. Os resultados demonstraram que houve aumento ($p < 0,001$) de TBARS, revelado pela absorbância, no córtex e hipocampo dos animais cronicamente infectados quando comparados aos animais NI (Figura 7.9.6A e B), indicando um aumento da peroxidação lipídica nessas estruturas cerebrais.

No córtex cerebral as intervenções terapêuticas com PTX ($p < 0,01$), Bz ($p < 0,05$), Bz+PTX ($p < 0,05$) e Fx ($p < 0,01$) reduziram a detecção por TBARS no córtex cerebral, quando comparado aos tecidos de animais cronicamente infectados e injetados com salina (Figura 7.9.6A), sugestivo de redução do dano oxidativo (Figura 7.9.6A).

Quando avaliada a peroxidação lipídica no hipocampo, nossos resultados demonstraram que os tratamentos com PTX ($p < 0,05$), Bz+PTX ($p < 0,01$) e Fx ($p < 0,01$) resultaram na diminuição da detecção de TBARS, quando comparados aos tecidos de animais cronicamente infectados e tratados com salina (Figura 7.9.6B).

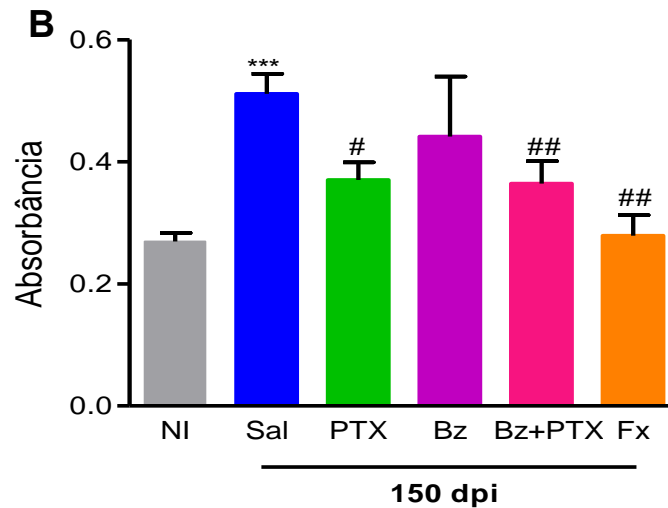
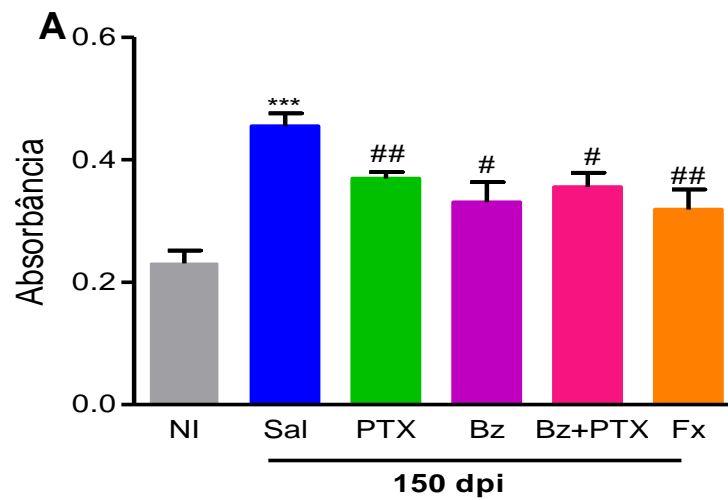
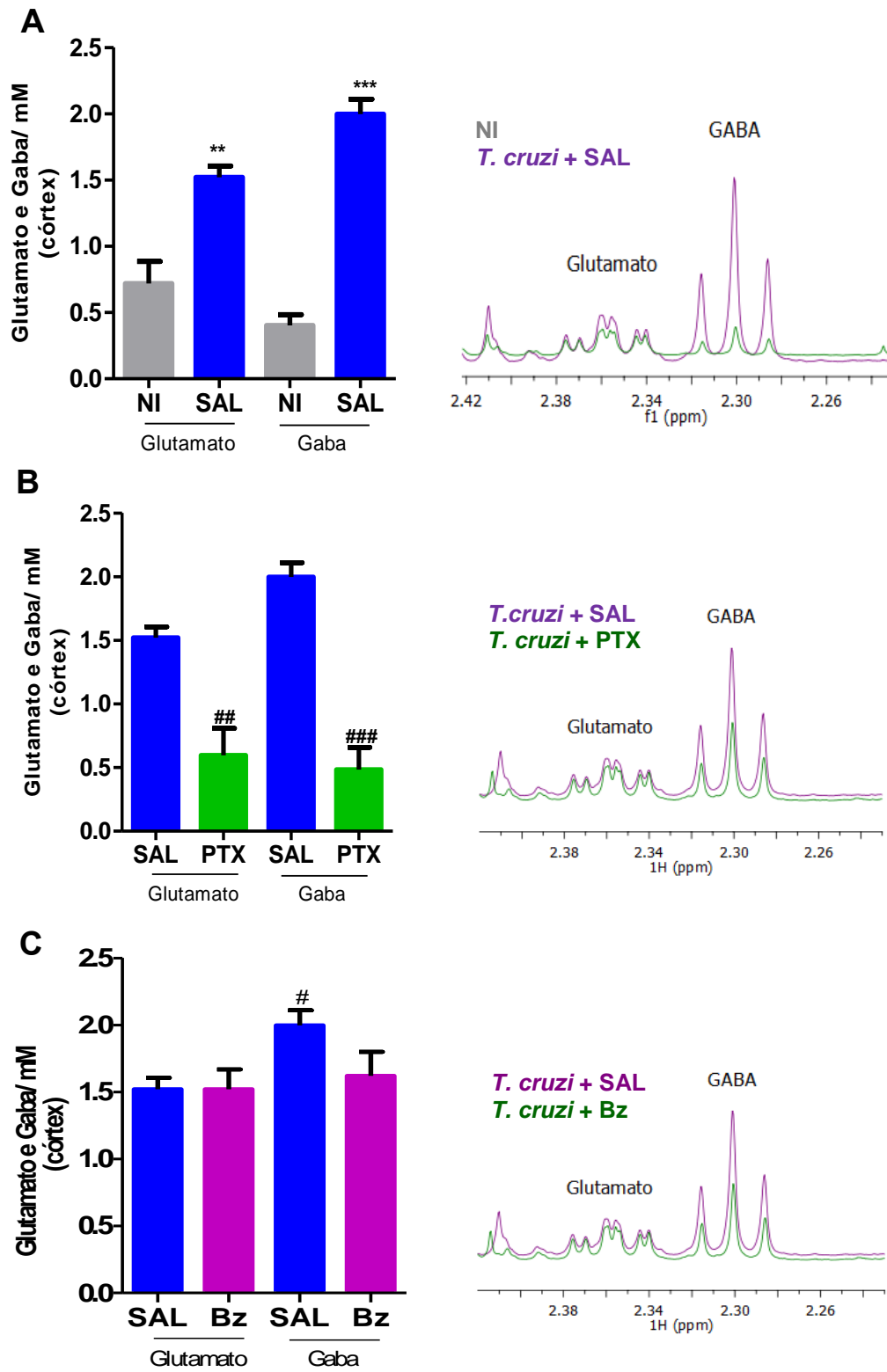


Figura 7.9.6: Intervenções terapêuticas específicas reduzem estresse oxidativo detectado por reação com TBARS em córtex e hipocampo de camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). (A) O gráfico indica que as terapias reduziram o estresse oxidativo no córtex cerebral, quando comparado aos tecidos dos animais infectados que receberam salina. (B) Redução do estresse oxidativo na região do hipocampo em animais que receberam intervenções terapêuticas. Os dados representam média ± DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dado representativo de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$, comparando NI com *T. cruzi* + salina; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$, comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

7.9.7 Intervenções terapêuticas com PTX, Bz+PTX e Fx diminuem a concentração dos neurotransmissores glutamato e GABA no córtex cerebral dos camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

Nossos resultados mostram aumento na concentração dos neurotransmissores glutamato ($p < 0,01$) e GABA ($p < 0,001$) no córtex dos animais cronicamente (150 dpi) infectados pelo *T. cruzi* (Figura 9.7.7A). Após terapia com PTX ($p < 0,01$; $p < 0,001$), Bz+PTX ($p < 0,05$; $p < 0,01$) e Fx ($p < 0,01$; $p < 0,001$) houve a redução na concentração de glutamato e GABA, respectivamente, no córtex cerebral, quando comparado aos tecidos dos animais infectados injetados com salina (Figura 9.7.7B-E). Por outro lado, a terapia com Bz não teve impacto nas concentrações aumentadas dos neurotransmissores glutamato e GABA em córtex de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* (Figura 9.7.7C).



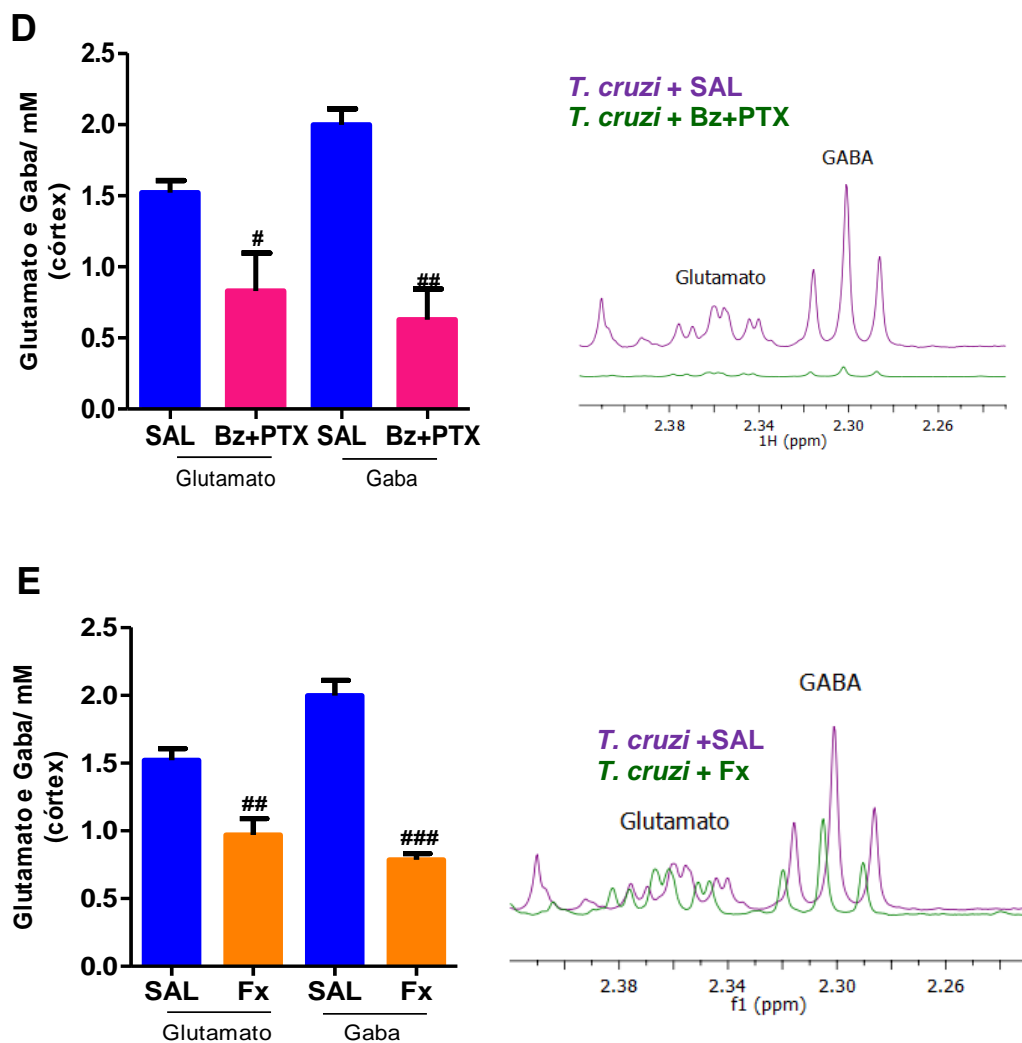
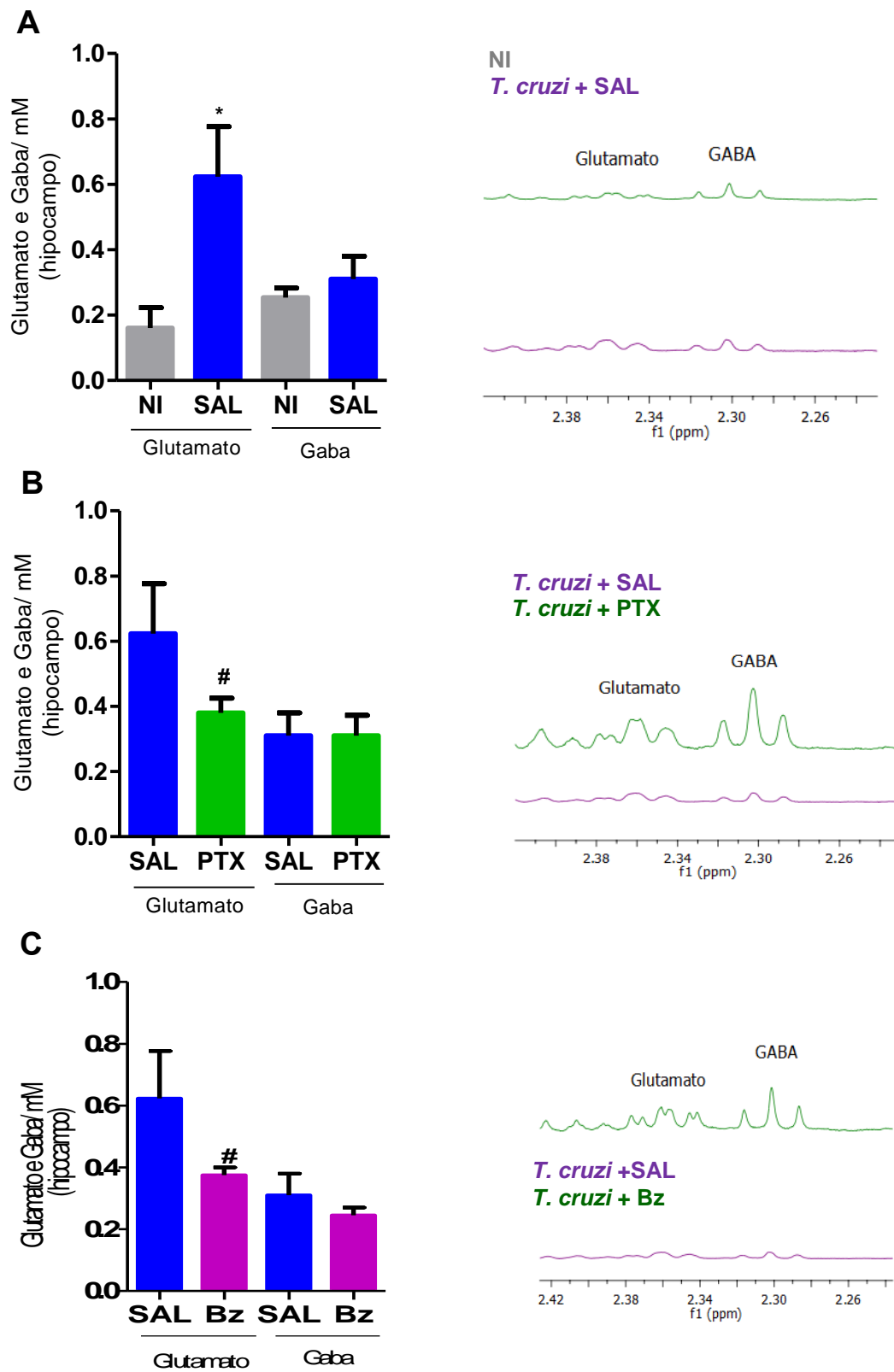


Figura 7.9.7 Intervenções terapêuticas reduzem concentrações de glutamato e GABA no córtex cerebral de camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção (150 dpi). As concentrações de neurotransmissores foram dosadas por ressonância nuclear magnética. (A) Aumento da concentração de glutamato e GABA no córtex dos animais cronicamente infectados (150 dpi). (B–E) Os gráficos mostram que as terapias com PTX, Bz+PTX e Fx reduziram a concentração dos neurotransmissores no córtex cerebral, quando comparados aos tecidos de animais infectados que receberam salina. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dado representativo de dois experimentos independentes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando NI com *T. cruzi* + salina, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

7.9.8 Intervenções terapêuticas diminuem a concentração do neurotransmissor glutamato no hipocampo dos camundongos C57BL/6 na fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

As concentrações de glutamato e Gaba presentes no hipocampo dos animais cronicamente infectados foram detectadas por ressonância nuclear magnética. Nossos resultados mostraram aumento nas concentrações de glutamato, mas de GABA, no hipocampo de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, comparados a tecidos de animais NI pareados por idade e sexo (Figura 7.9.8A). As intervenções terapêuticas com PTX ($p < 0,05$), Bz ($p < 0,05$), Bz+PTX ($p < 0,05$) e Fx ($p < 0,01$) diminuíram as concentrações aumentadas de glutamato de animais infectados em comparação aos tecidos de animais injetados com salina (Figuras 7.9.8 B-E). Todas as terapias não interferiram nas concentrações de GABA no hipocampo de animais cronicamente infectados (Figuras 7.9.8 B-E).



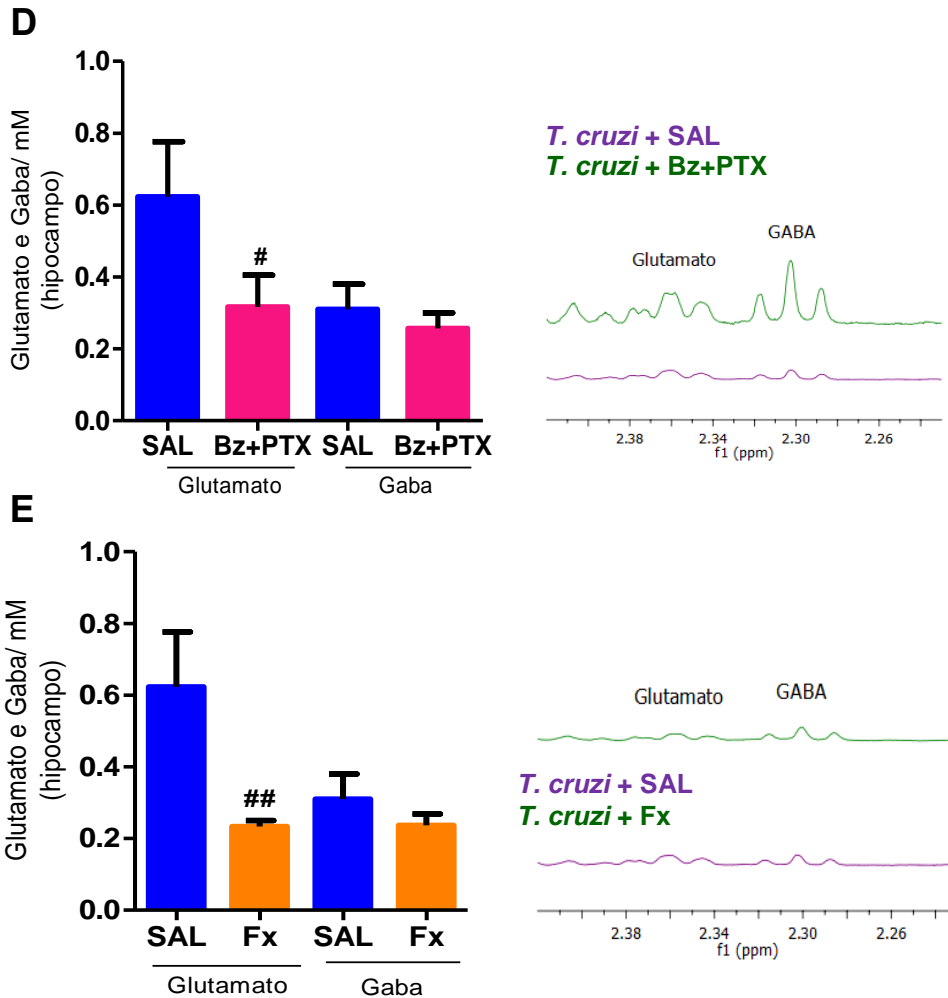


Figura 7.9.8 Intervenções terapêuticas reduzem concentrações de glutamato no hipocampo de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados (150 dpi). As concentrações de neurotransmissores foram dosadas por ressonância nuclear magnética. (A) Aumento da concentração de glutamato no hipocampo dos animais cronicamente infectados (150 dpi). (B –E) Os gráficos mostram que as terapias com PTX, Bz+PTX e FX reduziram a concentração do glutamato no hipocampo, comparado aos tecidos de animais infectados injetados com salina. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 5-16 camundongos. Dado representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, comparando NI com *T. cruzi* + salina; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

7.9.9 Intervenções terapêuticas aumentam a expressão gênica de BDNF no córtex cerebral dos camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

A expressão do fator neurotrófico BDNF foi detectada no córtex e hipocampo dos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, em comparação aos tecidos de animais não infectados, pareados por idade e sexo. Nossos resultados mostraram redução ($p < 0,05$) da expressão de BDNF no córtex de animais cronicamente infectados (150 dpi), em comparação a tecidos de animais NI. Aumento na expressão gênica do BDNF foi detectada no córtex cerebral dos animais infectados e tratados com PTX ($p < 0,05$), Bz ($p < 0,05$), Bz+PTX ($p < 0,05$) e Fx ($p < 0,05$) (Figuras 7.9.9 A). Os dados da expressão de BDNF em hipocampo de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* foram inconclusivos, merecendo novas análises.

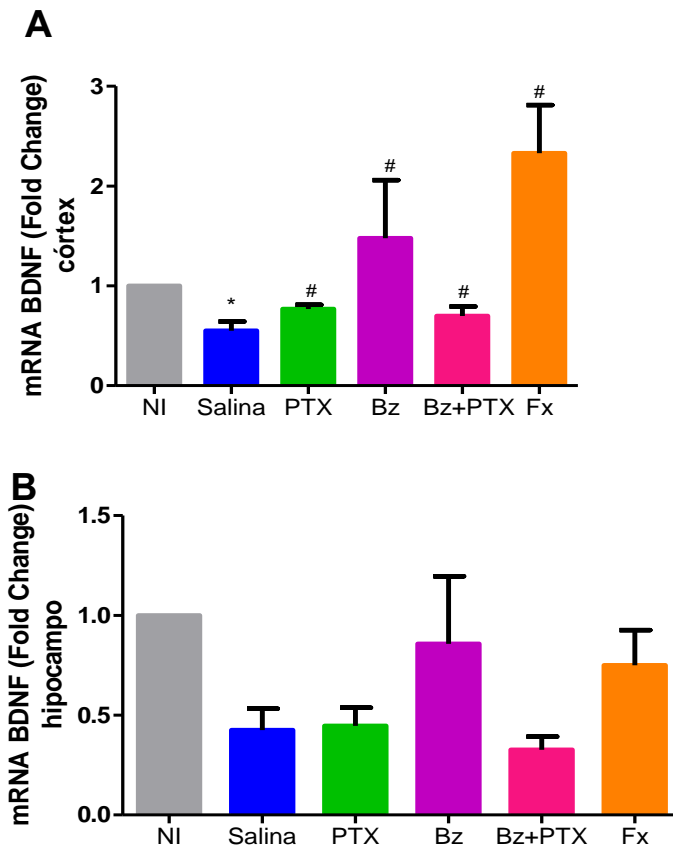


Figura 7.9.9 Intervenções terapêuticas aumentam a expressão gênica do BDNF no córtex de camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (150 dpi). (A) Terapias com PTX ($p < 0,05$), Bz ($p < 0,05$), Bz+PTX ($p < 0,05$) e Fx ($p < 0,05$) aumentaram a expressão de BDNF no córtex de animais cronicamente infectados. (B) Os dados de expressão de BDNF em hipocampo de animais infectados e tratados com as diferentes terapias foram inconclusivos. Os dados representam média \pm DP. Os grupos foram constituídos de 3-7 camundongos. Dado representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, comparando NI com *T. cruzi* + salina; # $p < 0,05$ comparando *T. cruzi* + salina com *T. cruzi* + terapias.

8. Discussão

Neste trabalho, trazemos um conjunto de evidências que camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* reproduzem algumas das alterações comportamentais descritas em portadores crônicos da DC. Para melhor entender e explorar os mecanismos que levam às diferentes manifestações de alterações comportamentais na DC utilizamos animais C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, classificada como *T. cruzi* I (Zingales et al. 2009), que permite a sobrevivência e o desenvolvimento da fase crônica da infecção. Reproduzimos em modelo de infecção experimental de camundongos C57BL/6 aspectos importantes da DC, sejam alterações comportamentais, como a depressão (Vilar-Pereira et al. 2012), sejam da forma cardíaca crônica com alterações elétricas e estresse oxidativo (Medeiros et al. 2009, Silverio et al. 2012, Silva et al. 2015). De forma importante, foi estabelecido uma relação causa/efeito entre a presença de estresse oxidativo e alterações de expressão de BDNF em tecido cerebral de camundongos comportamentais de fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*. Também, mostramos que o parasito, contribui direta ou indiretamente, para o desenvolvimento de alterações comportamentais em camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. Assim, usamos um modelo que reproduziu alterações comportamentais (depressão, ansiedade e distúrbios de memória) da DC, de modo a contribuir para a compreensão da patogenia da DC e propomos regimes terapêuticos baseados no controle de parasitos e no reposicionamento da resposta imune ou a combinação de ambas as estratégias, visando melhorar o prognóstico dos portadores da DC.

Mostramos achados característicos da infecção experimental como parasitemia, que alcançou pico em 42- 45 dpi (fase aguda) e controle após 90 dpi (fase crônica), quando raros parasitos são encontrados no sangue circulante (Silverio et al. 2012). A sobrevivência dos animais foi superior a 70% (Silverio et al. 2012; Vilar-Pereira et al. 2015). Aspectos clínicos também foram avaliados, como variação no peso e temperatura dos animais. Grave perda de peso corporal (cerca de 20-30%) foi observada em camundongos da linhagem C3H/He na fase aguda (12-30 dpi) da infecção com a cepa Tipo VI RA (Cazorla et al. 2015) e na infecção aguda (21-30 dpi) de camundongos BALB/c pela

cepa Tipo II Y (Silva et al. 2012). Não detectamos variação de peso corporal dos animais C57BL/6 durante o período de acompanhamento da infecção pela cepa Tipo I Colombiana. Estes diferentes achados quanto à perda de peso corporal observados nos estudos podem ser ocasionados pelo uso de diferentes linhagens de camundongos e cepas do *T. cruzi*, refletindo as diferentes relações entre parasito e hospedeiro. Camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* apresentaram manifestação moderada da forma cardíaca e menores concentrações de TNF circulante quando comparados a animais C3H/He infectados com a mesma cepa (Pereira et al. 2014a). Além disso, camundongos das linhagens C3H/He e C57BL/6, suscetível e resistente, respectivamente, ao desenvolvimento da meningoencefalite aguda, quando infectados pelo *T. cruzi*, apresentam alterações comportamentais independente da linhagem de camundongos, reforçando que características do hospedeiro são determinantes para as manifestações clínicas da DC experimental (Roffê et al. 2003).

Diminuição de temperatura foi observada na infecção de camundongos BALB/c infectados com a cepa Y na fase aguda e associada a perda de peso, caquexia e alterações comportamentais precedendo a morte (Silva et al. 2012). No presente estudo, não foi observada, em diferentes momentos na cinética da infecção, variação na temperatura retal, não caracterizando a presença de comportamento associado à doença (*sickness behavior*) que se caracteriza por sinais que incluem entre outros anedonia e diminuição do apetite e, assim, corroboramos dados anteriores (Vilar-Pereira et al. 2015). Estas características podem contribuir para que, de modo relevante, em nosso estudo a maioria dos animais infectados sobreviva à infecção aguda e desenvolva a forma crônica da DC.

Na fase crônica (150 dpi), quando a parasitemia já estava controlada, todos os animais apresentavam alterações elétricas como ART, BAV2, bradicardia e prolongamento dos intervalos PR e QTc. Estudo anterior utilizando o mesmo modelo mostrou uma relação direta entre a parasitemia e o parasitismo cardíaco (Silverio et al. 2012), sugerindo que as alterações elétricas não estão diretamente relacionadas à carga parasitária no tecido cardíaco. Como revisto anteriormente, a carga parasitária aumentada na fase aguda é controlada à medida que a resposta imune se estabelece e não está, proporcionalmente, relacionada à evolução clínica da DC (Junqueira et al. 2010). Melo e

colaboradores (2015) mostraram que a carga parasitária, revelada por detecção de DNA do *T. cruzi* em soro, foi semelhante nas formas clínicas indeterminada, digestiva e cardíaca da DC. Também, o estudo BENEFIT, no qual portadores crônicos da forma cardíaca da DC foram tratados com Benznidazol, mostrou que a redução na carga parasitária não impactou de forma significativa na deterioração clínica dos pacientes (Morillo et al. 2015).

Em relação às alterações comportamentais, nos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, a comportamento semelhante à depressão ocorre em paralelo às alterações cardíacas como bradicardias, ART e BAV2 (Silverio et al. 2012), características da DC (Rassi Jr et al. 2010). A associação entre depressão e doenças cardiovasculares está bem documentada. Tanto a depressão é um fator de risco para a doença cardiovascular quanto este o é para a depressão. Contudo, o mecanismo biológico que resulta nesta associação permanece desconhecido (Mosovich et al. 2008). No caso da DC crônica, não está claro se as alterações comportamentais resultam da presença do parasito no SNC, levando a lesões locais ou são consequências secundárias de alterações cardíacas, como aneurismas e processos tromboembólicos (Mosovich et al. 2008; Silva et al. 2010) ou ainda se envolvem outro processo fisiopatogênico, como, por exemplo, os processos inflamatórios crônicos. Em conjunto, os dados apresentados suportam que o modelo que adotamos reproduz aspectos importantes da DC, como a cinética de parasitemia, apresentando manifestações clínicas moderadas da forma cardíaca e taxa de sobrevivência, permitindo o uso deste modelo para explorar a hipótese do presente trabalho.

As alterações do SNC na DC se iniciam na fase aguda, clinicamente manifestada como meningoencefalite aguda, que surge geralmente, por volta da segunda e terceira semanas de evolução da doença concorrendo para o aumento da mortalidade nesta fase (Prata 2001, Rassi et al. 2010). No entanto, devido à falta de uma base anatômica, não há consenso sobre a existência de uma forma nervosa na fase crônica da DC (Pittella 2009). O conhecimento de ser um portador de DC pode provocar distúrbios psicológicos, em particular porque não existe cura para esta doença (Mota et al. 2006). Como resultado de ser portador da doença associado às dificuldades sociais, econômicas, laborais e psicológicas que estão relacionadas, os portadores da DC não conseguem enfrentar estas condições, podendo desenvolver sintomas depressivos. Assim,

portadores da DC podem ter comprometida sua qualidade de vida (Hueb & Loureiro de 2005, Osaki et al. 2011). Há uma lacuna no conhecimento sobre a associação de DC crônica e a comorbidade com depressão, ansiedade, déficit mnemônicos e seu impacto sobre o prognóstico clínico da doença. Assim, modelos experimentais que reproduzem aspectos das mudanças comportamentais de DC pode contribuir para identificar os fatores fisiopatológicos que levam à ansiedade, ao comportamento depressivo e ao distúrbios de memória em portadores da DC.

No presente estudo, foi utilizado o TST e FST para avaliar o comportamento depressivo. Nossos resultados mostraram um tempo de imobilidade maior, sugestivo de perfil depressivo, nos animais C57BL/6 infectados na fase crônica quando comparados ao grupo de animais NI, sendo este resultado observado tanto no TST quanto no FST. No estudo experimental de depressão os modelos experimentais de animais são desenvolvidos baseados nas consequências comportamentais do estresse, uso de drogas, lesão ou manipulações genéticas (Cryan et al. 2005, Ma et al. 2011). Considerar que um animal está deprimido não é tarefa fácil. Entretanto, existe a hipótese de que algumas espécies de animais podem exibir alterações do comportamento do tipo depressivo (*depressive-like behavior*). Vários testes têm sido validados para o estudo do comportamento depressivo, utilizando roedores (Nestler & Hyman, 2010). Dentre estes testes, a TST e o FST são amplamente utilizados, sendo adotados critérios para validação quanto à previsibilidade, semelhança e homologia ao comportamento humano (Porsolt et al. 1977; Steru et al. 1985). Assim, nossos resultados suportam a existência de um componente não psicológico neste modelo experimental da DC, corroborando nossas descobertas anteriores (Villar-Pereira et al. 2012), sugerindo que a infecção crônica pelo *T. cruzi* levaria a um perfil depressivo. Dessa forma, este modelo foi mostrado ser apropriado para testar a coexistência de outras alterações comportamentais como ansiedade, comportamento compulsivo inato, distúrbios locomotores e memória infecção chagásica crônica.

A ansiedade é considerada um distúrbio psiquiátrico caracterizado pelo medo desproporcional em situações que representam estresse, perigo, ameaças reais ou desafios diários (Moutier & Stein, 1999, Graeff, 2005, Martin et al. 2010). Ainda que não seja possível assegurar que animais compartilhem

das mesmas sensações subjetivas de ansiedade que os seres humanos, parece existir uma correspondência muito grande entre as espécies em relação aos mecanismos neurais e funções comportamentais subjacentes a essa emoção, desde a percepção de situações sinalizadoras de um perigo em potencial até a organização das reações de defesa. Existem vários testes descritos na literatura para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em modelos experimentais (Lister, 1990; Litvin et al. 2008), que foram validados com base na semelhança relativa das respostas comportamentais, fisiológicas e farmacológicas frente a situações ameaçadoras em roedores e seres humanos (Lister, 1990; Blanchard et al. 2008). No presente estudo, utilizamos o LCE e o teste do campo aberto que figuram entre os modelos animais de ansiedade mais utilizados para o estudo experimental da ansiedade (Lister 1990, Hall 1941). O LCE é um modelo baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos, e os animais tendem a evitar locais desprotegidos e elevados (Graeff & Guimarães, 2000), representados no teste pelos braços abertos. Os nossos dados confirmam que camundongos C57BL/6 cronicamente infectados apresentam um perfil ansiogênico com redução do número de entradas nos braços abertos, assim como na latência nos mesmos. Avaliamos, também, o comportamento inato compulsivo usando o teste de esconder esferas, que foi originalmente proposto como um modelo pré-clínico para teste de drogas para ansiedade (Borsini et al. 2002, Li et al. 2006). Em nosso estudo, após ser exposto a esferas de vidro, que representam um objeto estranho no ambiente familiar, cuja presença significa uma ameaça, os animais NI exibiram intensa atividade para esconder as esferas. Por outro lado, camundongos cronicamente infectados não mostraram esse tipo de comportamento. Estes dados suportam que camundongos infectados pelo *T. cruzi* não apresentam o comportamento inato compulsivo e apresentam um perfil de ansiedade. A ansiedade é considerada uma condição debilitante que reduz significativamente a qualidade de vida do indivíduo afetado, seja em suas relações pessoais, sociais ou profissionais (Mulumo et al. 2012).

No teste do campo aberto, a tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por novas situações e ambientes (Montgomery, 1958). Desta forma, a locomoção nas linhas totais e centrais dos animais, observados no campo

aberto, são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências de eventos que ocorrem na vida que nos levam a confrontar com ambientes e situações novas (Montgomery, 1958; Arakawa & Ikeda, 1991, Rex et al. 1996). A investigação de atividades de locomoção mostrou que camundongos C57BL/6 cronicamente infectados apresentam uma diminuição nas atividades locomotora / exploratória, quando comparados com os animais NI. Uchôa e colaboradores (2002) afirmam que na DC o conhecimento do diagnóstico de soropositividade desencadeia muita apreensão em função de uma concepção de doença associada a limitações progressivas, à inexistência de tratamento eficaz e a idéia de que a morte pode ocorrer a qualquer momento. Além disto, segundo estes autores, o fato da DC comprometer órgãos como coração e de repercutir negativamente sobre a vida profissional dos indivíduos infectados é considerado como o principal agravante da DC. Pacientes com DC apresentam elevados níveis de sintomas psicológicos e de estresse (Mota et al. 2006, Osaky et al. 2011). Observamos, portanto, na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, que os animais apesar do baixo parasitismo e ausência de infiltrados inflamatórios no SNC (Silva et al. 1999, Roffe et al. 2003, Silva et al. 2015), exibiram uma notável alteração em aspectos de seu comportamento, consistente com sinais de depressão e ansiedade, sugerindo que os mecanismos que levam a este quadro podem estar relacionados direta ou indiretamente com a persistência do parasito no SNC.

Considerando que comportamentos característicos de doença podem contribuir para alterações comportamentais, avaliamos o comportamento associado à doença (*sickness behavior*), verificando apatia, perda de peso corporal (que revela perda de apetite) e temperatura (indicativo de febre), em 150 dpi. Apatia e prostração e febre não foram detectadas em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados. Assim, estes dados descartaram a presença de *sickness behavior* e reforçaram a existência de depressão e ansiedade no modelo de infecção crônica de camundongos C57BL/6 com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Dissociada possível interferência relacionada a *sickness behavior*, o modelo experimental que adotamos reflete aspectos importantes de modo a formar pontes entre os modelos animais de distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos e os distúrbios neurológicos observados em seres humanos por Carlos Chagas desde a descoberta da doença. Portanto, este modelo de DC experimental crônico pode oferecer uma oportunidade para desvendar

mecanismos celulares e moleculares que levam a alterações comportamentais que contribuem para diminuir a qualidade de vida dos portadores da DC. Além de enfrentar uma perturbação no bem-estar psicológico, indivíduos com ansiedade e depressão também estão em risco de condições adicionais como doenças cardíacas e obesidade (Sheps & Sheffield 2001, Rumsfeld & Ho 2005). Assim, de forma mais ampla, o nosso modelo de comorbidade entre depressão e ansiedade, na presença de cardiomiopatia grave (Silverio et al. 2012, Pereira et al. 2014, Pereira et al. 2015), pode oferecer uma oportunidade para explorar aspectos mecanísticos e ferramentas terapêuticas que possam, também, ser aplicáveis a distúrbios comportamentais não-infecciosos.

São poucos os estudos na literatura sobre alterações cognitivas e psicossociais associados à DC. Predominam os estudos com métodos socioantropológicos, que abordam representações, crenças, valores e comportamentos relacionados à doença, tendo por principal recurso as entrevistas e a observação do participante, buscando por meio da análise de conteúdo a compreensão das histórias e do estilo de vida dos portadores da DC (Araujo et al. 2000; Uchôa et al. 2002). Em relação aos estudos sobre alterações cognitivas, Hueb & Loureiro (2005) publicaram uma revisão sobre o assunto. Destacaram cinco principais artigos incluídos nesta categoria que pesquisaram, predominantemente, a inteligência em seus aspectos gerais e específicos, tais como a percepção, a memória, a atenção e a psicomotricidade, trabalhando com a hipótese de que a DC afeta o funcionamento cognitivo dos portadores. Dos cinco artigos analisados, quatro estudos do tipo caso-controle apontaram prejuízos cognitivos associados à DC (Jörg et al. 1972; Pereyra, 1992; Mangone et al. 1994a) e identificaram tanto o comprometimento da inteligência geral quanto o da inteligência específica. No que diz respeito aos processos mnemônicos, dois artigos (Jörg et al. 1972; Mangone et al. 1994a) relataram também déficit de atenção. No presente trabalho, utilizamos para avaliação da memória na infecção experimental pelo *T. cruzi* os testes de esquiva passiva, memória de habituação e teste de reconhecimentos de objetos. A tarefa de esquiva passiva apresenta caráter aversivo e envolve aprendizado associativo, uma vez que o animal aprende a inibir um comportamento para evitar receber um estímulo aversivo (leve choque elétrico nas patas). Nossos resultados mostraram que camundongos da linhagem C57BL/6 cronicamente infectados pelo *T. cruzi* não apresentaram

déficit mnemônico, com relação a formação da memória aversiva. De fato, estudos sugerem que a persistência do traço mnemônico será mais forte se estiver associado a um componente emocional. Experiências de ocasiões desagradáveis, como um acidente de carro, um assalto, ou aprender sobre a morte de um ente querido, são mais lembrados do que experiências de um dia de rotina (McGaugh, 2013).

Por outro lado, a tarefa de reconhecimento de objeto é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido. O teste se baseia numa tarefa de caráter não aversivo que envolve aprendizado não associativo (Izquierdo, 2002). A análise dos nossos resultados sugere que os animais cronicamente infectados não tiveram um desempenho adequado da memória, isso se refletiu no tempo de reconhecimento do objeto novo em relação ao familiar que foi semelhante no dia do teste. O déficit em distinguir as diferenças entre o objeto novo e o familiar indica que a infecção pelo *T. cruzi* prejudicou a capacidade de memorização e exploração de objetos, nos animais cronicamente infectados. Ainda, quando testados para memória de habituação no campo aberto, verificamos que a infecção pelo *T. cruzi* também interferiu na tarefa de habituação ao ambiente nos animais cronicamente infectados, o que ficou representado pela semelhança da atividade exploratória destes animais nos dois dias de testes. Tem sido proposto que os testes de reconhecimento de objeto e de habituação apresentam analogias com testes de memória que são utilizados em seres humanos para caracterizar síndromes amnésicas, pois fornecem um índice acurado do grau de gravidade geral de prejuízos de memória declarativa (Reed & Squire, 1997; Dix & Aggleton, 1999). A análise da exploração dos lugares e objetos novos observada na fase crônica da infecção na linhagem C57BL/6 nos testes de memória sugere que a infecção pelo *T. cruzi* pode afetar o desempenho da memória. Como esses testes requerem a participação do hipocampo (Rossato et al. 2007), podemos sugerir que essa área pode estar comprometida pela infecção, além do possível comprometimento de fatores neurotróficos que medeiam várias funções celulares que estão envolvidas na regulação da neuroplasticidade, tornando o cérebro capaz de se adaptar e responder perante vários estímulos (Manji et al. 2003, Schmidt et al. 2008) .

De fato, Silva e colaboradores (1999a) mostraram que o hipocampo é acometido pelo *T. cruzi* e por células inflamatórias. Em outra neuroinfecção, a toxoplasmose, Zhu (2009) e Fekadu et al (2010) propuseram a hipótese de que o parasito intracelular *Toxoplasma gondii*, que se localiza preferencialmente em sítios do SNC, pode levar a psicoses em alguns pacientes. Segundo os autores, o SNC é o tecido mais comumente afetado pelo estado latente da toxoplasmose, podendo exercer, em certo grau, alterações no desenvolvimento cognitivo e emocional. Os resultados destes estudos mostraram alterações no desempenho psicomotor; capacidade de aprendizado e memória diminuída. Os autores sugerem que alguns sintomas psiquiátricos podem ser causados pela infecção parasitária. Como na toxoplasmose, nossos resultados também sugerem que a persistência do parasito *T. cruzi*, possa levar a consequências cognitivas, independente da inflamação, já que a linhagem C57BL/6 é considerada resistente ao desenvolvimento da meningoencefalite (Roffê et al. 2003). Prost e colaboradores (2000) demonstraram um aumento da latência de detecção de potenciais evocados P300 e alterações eletroencefalográficas em 20% de pacientes portadores da DC e observaram que os achados neurológicos não se correlacionaram com as alterações cardíacas observadas. Arankowaky-Sandoval e colaboradores (2001) demonstraram disfunção do sono e perda de memória em ratos infectados pelo *T. cruzi*, embora estas condições possam ser causadas por lesões do SNC, os autores não excluíram a influência das alterações cardíacas no processo. Achados neurológicos da fase crônica foram relatados inicialmente por Carlos Chagas e eles incluíam alterações no desempenho cognitivo (Chagas, 1911). Wackermann e colaboradores (2008) relataram uma discreta e inespecífica perturbação funcional cortical e possíveis lesões na substância branca de portadores crônicos da DC.

Doenças crônicas como a DC podem causar ou precipitar transtornos mentais em decorrência de efeitos no SNC. Os transtornos depressivos podem resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos (Duman et al. 1997, Nestler, 2002, Sibille & Lewis, 2006, Gardner & Boles, 2011). Os trabalhos sobre depressão enfocam modificações na concentração de neurotransmissores ou dos níveis de expressão de seus receptores na membrana celular. Os resultados destes estudos são diversos com a observação de que a ação terapêutica de antidepressivos requer administração

crônica, embora a inibição da recaptação de serotonina ocorra imediatamente (Duman, 2001; Sibille & Lewis, 2006, Ruhé et al. 2007). No presente estudo testamos o efeito da Fx, inibidor da recaptação da serotonina, que tem sido amplamente reconhecido como um medicamento para a depressão (Wong et al. 2005), na fase crônica da DC para investigar a ação da FX na infecção pelo *T. cruzi*, em especial sobre as alterações comportamentais. Para avaliar se durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, o tratamento com Fx afeta a função elétrica cardíaca, todos os animais foram submetidos à avaliação eletrocardiográfica após o tratamento. Sintomas depressivos e doenças cardiovasculares têm sido considerados comorbidades, com risco significativo de mortalidade (Mavrides & Nemeroff, 2015), trazendo implicações negativas para a qualidade de vida dos pacientes (Penninx et al. 2013). Alguns estudos relatam que embora os inibidores da recaptação da serotonina sejam altamente eficazes na melhoria do humor em pacientes deprimidos, esta classe de drogas pode estar associada com a promoção de uma série de efeitos biológicos negativos relacionados com aumento do risco cardíaco como ART, fibrilação e prolongamento do intervalo QT (Beach et al. 2014). Outros estudos, porém, relatam que a Fx é eficiente tanto para sintomas depressivos quanto para melhora do prognóstico de doenças cardiovasculares (Mavrides & Nemeroff, 2015, Nezafati et al. 2015). Nossos resultados mostraram que a terapia com Fx resultou em melhora da função elétrica cardíaca, caracterizada por redução de ART e BAV2. O prolongamento do intervalo QTc, uma medida do atraso da repolarização ventricular e um marcador de risco no desenvolvimento de arritmia cardíaca, também teve seu intervalo reduzido nos animais cronicamente infectados e tratados com Fx. Embora a eficácia da Fx tenha sido demonstrada em alguns estudos, mas não todos, nossos resultados sustentam que a terapia com Fx na infecção crônica pelo *T. cruzi* pode ser benéfico nas alterações eletrocardiográficas. Nossos resultados também confirmam a existência do perfil depressivo durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, pois a administração de Fx resultou na reversão do comportamento depressivo nos camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, quando analisado no TST e FST. Constituem evidências de alteração neuroquímica no SNC compatível com depressão (i) aumento da expressão de mRNA codificante da enzima IDO, que degrada triptofano resultando na

diminuição da síntese de serotonina no SNC e (ii) reversão do comportamento depressivo pelo antidepressivo fluoxetina (Vilar-Pereira et al. 2012).

A relação entre depressão e ansiedade é tema de diversos estudos e propostas de comorbidades. Sintomas de ansiedade são comuns durante episódios depressivos e, em geral, são relacionados a pior prognóstico (Fava et al. 2000, Lapmanee et al. 2013, Adams et al. 2016). A presença de sintomas da DC é um fator de risco para o desenvolvimento de sentimentos de desesperança, dificuldades emocionais e baixa capacidade de resiliência (Mota et al. 2006, Guimarães et al. 2014). De forma geral, existe consenso na literatura que as drogas mais indicadas para o tratamento dos transtornos de ansiedade são os antidepressivos. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina têm sido considerados como primeira opção para a maior parte destes casos, pela sua maior tolerabilidade, por ser bastante útil para tratamento de manutenção e prevenção de recaídas, com boa relação eficácia/tolerabilidade e maior facilidade posológica (Hoffman & Mathew, 2008, Ravindran & Stein, 2010). Nossos resultados mostraram que os animais cronicamente infectados que receberam Fx, comparado aos animais que foram tratados com salina apresentaram efeitos ansiolíticos no LCE. A literatura é contraditória quanto aos efeitos dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina em modelos pré-clínicos de ansiedade. Assim, enquanto alguns estudos relatam a produção de efeitos ansiogênicos no LCE após a administração aguda e crônica dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (Handley & MacBlane, 1993, Petkov et al. 1995; Silva & Brandão 2000), outros relatam efeitos ansiolíticos dos tratamentos crônicos (Huot et al. 2001), ou ausência de efeitos tanto em tratamentos agudos e crônicos com estes agentes (Griebel et al. 1997;). Nossos dados mostraram que o tratamento com inibidor seletivo da recaptação de serotonina teve efeito benéfico no comportamento de ansiedade, mas os resultados foram mais consistentes em relação aos testes de depressão e no teste de comportamento compulsivo inato. Nestes, os tratamentos com Fx reverteram não só o perfil depressivo como retornou o comportamento inato nos animais de enterrar materiais aversivos presentes em seu ambiente semelhante aos animais NI.

Pacientes com transtornos psiquiátricos, não raramente apresentam prejuízos cognitivos, alterações nas funções de memória e aprendizado (Ravnskilde, 2002, Pardo, 2006). Alterações no funcionamento cognitivo de

pacientes deprimidos são corroboradas por estudos de neuroimagem que indicam alterações no funcionamento cerebral (Eugene et al. 2003; Rogers et al. 2004). Esses prejuízos cognitivos seriam revertidos através do tratamento com antidepressivos (Castaneda et al. 2007) e evidências sugerem que essa melhora está associada a modificações no sistema monoaminérgico (Lee et al. 2010). No presente estudo, a memória aversiva, na qual o animal aprende a inibir uma resposta para não receber um estímulo de aversão (choque) foi preservado nos animais infectados que receberam o tratamento com Fx ou salina sugerindo que a infecção pelo *T. cruzi* não interfere na memória aversiva dos animais infectados. As tarefas de condicionamento de medo ao estímulo e contexto dependem de diferentes estruturas cerebrais. Sabe-se que a amígdala é uma região importante e necessária para as reações de medo, tanto inatas, como aprendidas e os tipos de condicionamento clássico de medo dependem da integridade dessa região (LeDoux et al. 2004). Já o hipocampo é necessário para o condicionamento ao contexto, possivelmente devido à sua função sobre o processamento de informações espaciais e formação de mapas cognitivos. Alterações no hipocampo, portanto, afetam respostas condicionadas ao contexto, sem interferir com as respostas condicionadas aos estímulos aversivos. Nossos resultados demonstraram que, a infecção crônica pelo *T. cruzi*, não desfavorece a manutenção do circuito do condicionamento ao medo. Além disso, o tratamento com Fx, nos animais cronicamente infectados, foi capaz de promover melhora no processamento de estímulos de orientação visuo-espaciais das memórias de habituação e de reconhecimento de objetos.

Miller (1975) já havia evidenciado a associação de formas moderadas de depressão e comprometimentos em várias tarefas cognitivas, motoras, perceptivas e de comunicação. Esse autor localizou déficits cognitivos na inteligência global, na capacidade visoespacial, na memória e na aprendizagem, na capacidade de raciocínio abstrato, na linguagem e na velocidade de processamento. Sua conclusão foi a de que em todos os tipos de depressão existe algum nível de prejuízo cognitivo. A literatura demonstra principalmente alterações no processamento e organização do conteúdo perceptual, na memória operacional, na capacidade de atenção, nas funções executivas, e na velocidade de processamento cognitivo (Rogers et al. 2004; Steele & Lawrie, 2004). Na DC, Hueb & Loureiro (2005), em artigo de revisão a cerca dos aspectos cognitivos e psicossociais associados à DC, identificaram

estudos com portadores dessa enfermidade, sem especificar a forma manifesta da mesma, relatando prejuízos quanto à memória visual e performance cognitiva reduzida. Jörg e colaboradores (1994) destacam o comprometimento de aspectos psicológicos do paciente ao tomar conhecimento da infecção chagásica. Nessa situação, ocorre o desenvolvimento de uma sintomatologia reativa, que vai desde uma depressão leve à síndrome de alexitimia (dificuldade para expressar e descrever sentimentos), que pode ser desencadeada pelo temor oculto da evolução maligna e pela impossibilidade de deter a doença. Os autores destacam a associação de manifestações psíquicas e mentais à DC, independentemente da forma apresentada, considerando que os aspectos psicológicos influenciam na evolução da doença e na vida de seus portadores. Nossos resultados corroboram resultados de pesquisas que relataram a favorecimento da depressão e da memória pelo uso da Fx (Jaykaran et al. 2009, Yun et al. 2015, Yu et al. 2016). De fato, observamos melhora cognitiva em ambas as modalidades de testes de evocação de memória no tratamento dos animais cronicamente infectados. Nesse sentido, o tratamento com Fx mostrou-se eficiente podendo ser este um caminho terapêutico sugestivo para melhora da qualidade de vida dos portadores da DC.

Procurando trazer contribuição para o entendimento dos mecanismos que levam às alterações comportamentais, nós desafiamos a ideia de que a persistência do *T. cruzi* e o desequilíbrio imune contribuem para estas alterações comportamentais na DC. Assim, propusemos regimes terapêuticos baseados no controle do parasito e no reposicionamento da resposta imune ou a combinação de ambas as estratégias. A dose sub-ótima de Bz reduziu a carga parasitária e PTX não interferiu na eficácia de Bz tanto no parasitismo no tecido cardíaco como no SNC. Embora tenha ocorrido efeito benéfico nas anormalidades elétricas cardíacas com os três regimes terapêuticos na infecção, os efeitos da terapia de combinada Bz+PTX foram mais proeminentes. Há um consenso em estudos que a persistência do *T. cruzi* e a desregulação imunológica impulsionada pela infecção, contribuem para a CCC (Silva et al. 2003, Pereira et al. 2015). Atualmente, medicamentos utilizados para tratar a infecção pelo *T. cruzi* têm eficácia limitada e toxicidade registrados; portanto, existe uma necessidade de novos fármacos com maior eficácia e menos efeitos colaterais para lidar com a carga parasitária, reduzir

anormalidades imunológicas e melhorar os sinais clínicos (Lannes-Vieira et al. 2010, Guedes et al. 2011). Uma possível estratégia é a terapia combinada, como utilizada com sucesso para outras infecções tais como tuberculose, vírus da imunodeficiência humana e malária (Nahid et al. 2006, Simon et al. 2006, Ngasala et al. 2011).

Terapia com Bz (100 mg/Kg / dia), num modelo em ratos, com início na fase aguda da infecção, preveniu alterações elétricas na fase crônica sem a eliminação completa do *T. cruzi* (Garcia et al. 2005). Em pacientes com cardiomiopatia isquêmica não infecciosa, PTX mostrou efeito cardioprotetor em associação com redução na concentração plasmática de TNF, quando comparada à administração de placebo (Sliwa et al. 2004). Além disso, PTX foi benéfica para alterações elétricas e de células T em camundongos cronicamente infectados, que apresentaram sinais de CCC e resposta imune desequilibrada, independentemente da baixa persistência do parasitismo no coração (Pereira et al. 2015). Portanto, com o objetivo de reabilitar a resposta imune, controlar a carga parasitária e estando ciente da necessidade de minimizar os efeitos adversos da terapia com Bz (Guedes et al. 2011), combinamos PTX com uma dose sub-ótima (25 mg/Kg/dia) do medicamento tripanossomicida. Os nossos dados confirmam que a terapia com uma dose sub-ótima de Bz (25 mg/Kg /dia) reduziu ainda mais a carga parasitária nos animais cronicamente infectados com a cepa Colombiana. Além disso, nossos dados confirmaram que a terapia com PTX não alterou a parasitemia e o parasitismo no coração, contudo reduziu o parasitismo no SNC, nas áreas de córtex cerebral e hipocampo. Dados recentes do nosso laboratório demonstraram que PTX reduz carga parasitaria em astrócitos, em estudos in vitro, sugerindo que seja via redução da expressão de TNFR1 e redução da ação de TNF, citocina que favorece a infecção e a proliferação do *T.cruzi* em astrócitos (Rodrigues-Silva et al. manuscrito em preparação).

Além disso, nossos dados demonstram que a administração combinada de PTX com dose sub-ótima de Bz não interferiu com a eficácia tripanossomicida de Bz. Embora as cargas de parasitos no sangue periférico, no coração e no tecido cerebral tenham sido reduzidas pelas terapias, não houve nenhuma cura parasitológica. Pode-se argumentar que foi devido à resistência da cepa Colombiana ao Bz; entretanto, nossos resultados corroboram dados previamente relatados que mostram que doses de Bz, ótima

(100mg/Kg/dia) e sub-ótima (25 mg/Kg/dia), foram eficientes para reduzir a carga parasitária e promover a sobrevivência em camundongos imunocompetentes infectados com a cepa Colombiana em animais imunocompetentes (Garcia et al. 2005). No entanto, a eliminação do parasito não é um pré-requisito para melhor prognóstico na DC. Um estudo recente revelou não haver diferenças na carga parasitária de pacientes com a forma indeterminada em comparações com pacientes com a forma cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva da DC (Melo et al. 2015). Além disso, estudos têm demonstrado que pacientes com DC crônica, submetidos a terapia com Bz, embora não curados, tiveram uma redução significativa na ocorrência de alterações no ECG e menor frequência de deterioração da condição clínica (Viotti et al. 2007). No entanto, em um estudo de acompanhamento de portadores da DC por 5 anos, quando administrado Bz em pacientes com cardiomiopatia observou-se redução na carga parasitária, estimada pela detecção de DNA do *T. cruzi* no soro, mas não impactou nos resultados clínicos, considerando as manifestações cardíacas (Morillo et al. 2015). De fato, a administração de Bz em cães cronicamente infectados mostrou-se eficiente para controle dos parasitos, mas não impediu a CCC (Santos et al. 2012). Por outro lado, o tratamento com Bz (100 mg/Kg/dia), iniciado na fase aguda da infecção impediu a CCC grave, apesar da falta de erradicação completa do parasito (Garcia et al. 2005).

A utilização das terapias com PTX, Bz, e Bz+PTX em camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* reduziu as frequências de camundongos apresentando ART e BAV2. Bradicardia e BAV2 são alterações no ECG associados com o agravamento da forma cardíaca na DC (Rassi, 2010). As terapias PTX e Bz+PTX reduziram o prolongamento do intervalo QTc, que se apresentou na infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, a terapia Bz+PTX reverteu o prolongamento do intervalo QTc, restaurando a um perfil de ECG semelhante ao dos animais NI. É importante relatar que o prolongamento do intervalo QTc representa um mau prognóstico para mortalidade na cardiopatia chagásica (Salles et al. 2003). Portanto, nossos dados sugerem que a terapia combinada Bz+PTX pode oferecer uma alternativa para melhorar a condição cardíaca de pacientes com DC e contribuir para um melhor prognóstico, como recentemente propusemos (Vila-Pereira & Pereira et al. 2016).

A propriedade anti-inflamatória da PTX baseia-se na capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF (Kwiecierz et al. 2004). A PTX penetra rapidamente na barreira hematoencefálica, após sua administração. Estudos têm demonstrado efeito neuroprotetor da PTX, em vários distúrbios neuro-comportamentais, como isquemia cerebral (Banfi et al. 2004, Bruno et al. 2009), neurotrauma, demência e epilepsia (Eun et al. 2000, Tariq et al. 2008). A PTX também reverte o déficit de memória provocado pelo glutamato (Cunha et al. 2000) e melhora o déficit de memória espacial provocado pela isquemia cerebral (Movassaghi et al. 2012). Nossos resultados na DC experimental mostraram que animais cronicamente infectados e tratados com PTX, Bz administrados individualmente ou como multiterapia Bz+PTX, reverteram o perfil depressivo e de ansiedade e melhoraram o déficit cognitivo no teste de habituação. Embora uma redução do parasitismo no SNC tenha sido observada na fase crônica da infecção, a maioria dos camundongos infectados mostrou parasitismo do SNC, corroborando os dados anteriores (Silva et al. 1999; Roffê et al. 2003; Vilar-Pereira et al. 2012) Mostramos, em estudos anteriores, que na DC experimental crônica há aumento de expressão de TNF mRNA no tecido cardíaco associado à inflamação, enquanto no SNC não há inflamação nem expressão detectável de TNF mRNA. Contudo, terapia com anti-TNF (Infliximab) reverte a depressão, implicando a inflamação periférica e o TNF na depressão na infecção crônica pelo *T. cruzi* (Vilar-Pereira et al., 2012). Pacientes na fase crônica da DC e co-infectados com HIV apresentam alterações neurológicas associadas com parasitismo no SNC (Rocha et al. 1994; Antunes et al. 2002). É importante ressaltar que as anormalidades neurológicas observadas em pacientes com DC co-infectados com HIV podem ser tratadas com sucesso usando a droga tripanossomicida Bz, confirmando a contribuição do parasito para as alterações do SNC (Antunes et al. 2002). Entretanto, não ficou claro se os parasitos presentes no SNC em episódios de reativação originam-se do parênquima do SNC, do líquido cefalorraquidiano ou resultam do sangue. A reativação da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos C3H/He cronicamente infectados submetidos à terapia imunossupressora ocorreu na ausência de parasitemia e foi restrita ao SNC (Roffê et al., 2003), reforçando que formas do *T. cruzi* persistem no SNC durante a fase crônica da infecção. Além disso, o parasitismo do SNC pelo *T. cruzi* associado com inflamação foi detectado em camundongos IL-12

knockout, mas não em camundongos IFN γ knockout, indicando que a deficiência parcial de IFN γ foi mais prejudicial do que a ausência de IFN γ como determinante da carga de parasitos no SNC (Michailowsky et al. 2001). Uma importante citocina relacionada ao contexto da infecção pelo *T. cruzi* é o TNF, que age como um segundo sinal na atividade indutora da produção de NO por macrófagos ativados por IFN γ (Aliberti et al. 2001). Entretanto, esses dados são relacionados ao papel dessas citocinas em células apresentadoras de antígeno profissionais (APC) e, assim como para o IFN γ , ainda não está claro o papel de TNF sobre a infecção do SNC pelo *T. cruzi*.

Estudo recente em nosso laboratório investigou a contribuição dos astrócitos, célula integrante da rede de manutenção dos neurônios, integridade das sinapses, para a manutenção de um ambiente inflamatório no SNC, e foi observado que, na presença de TNF ou infecção pelo *T. cruzi*, os astrócitos apresentaram aumento na produção de IL-6, a qual foi exacerbada na presença de ambos os estímulos (TNF mais infecção pelo *T. cruzi*); sugerindo que astrócitos infectados contribuem para a manutenção da inflamação no SNC, a qual, por sua vez, pode favorecer a persistência do próprio parasito. Ainda, ao avaliar a expressão do mRNA de TNF no cérebro de camundongos C3H/He agudamente infectados, níveis elevados na expressão desse transcrito, bem como altos níveis circulantes de TNF no soro foram detectados.

Em hospedeiros imunocompetentes, a persistência aparentemente silenciosa de formas amastigotas do *T. cruzi* no SNC tem sido contestada pela demonstração de alterações comportamentais como distúrbios do sono, déficit de memória, perda da qualidade de vida e depressão, relatados em crianças e adultos jovens durante a fase crônica da DC (Jorg e Rovira, 1981; Moncada, 1987; Silva et al., 2010). De fato, distúrbios do sono e déficit de memória foram detectados em ratos infectados pelo *T. cruzi* (Arankowsky-Sandoval et al., 2001), enquanto que o comportamento depressivo foi detectado em camundongos infectados cronicamente (Vilar-Pereira et al., 2012). Já foi mostrado anteriormente que produtos oriundos de patógenos bem como mediadores da resposta imune do hospedeiro, como citocinas, dentre elas IFN γ e TNF, podem contribuir para transtornos de humor e déficit cognitivo (Dantzer & Kelley, 2007; Dantzer et al., 2008; Maes et al., 2009; Miller, 2010, Yr). De fato, mostramos com nossos resultados que as terapias com Bz, PTX, Bz+PTX na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* foram capaz de reverter a ocorrência

de comportamento depressivo além de ter efeito benéfico no déficit cognitivo nos animais. Assim, sugerimos que produtos do parasito, mediadores imunológicos e liberação induzida pelo *T. cruzi* de mediadores inflamatórios (como NO e citocinas) no SNC podem contribuir para os distúrbios de comportamento detectados em pacientes com DC infectados cronicamente e em modelos experimentais de infecção chagásica (Vieira, 1964; Silva et al. 2010; Vilar-Pereira et al. 2012, 2015).

Nosso estudo procurou avaliar o impacto do Bz e da PTX sobre os parâmetros de estresse oxidativo em diferentes regiões cerebrais (córtex e hipocampo), procurando correlacioná-los às alterações comportamentais estudadas. No hipocampo, estrutura que possui papel importante na formação da memória, e no córtex, sede da personalidade e da vida intelectual que tem a possibilidade de criar comportamentos adaptativos adequados às diversas situações, foi observado um aumento da lipoperoxidação, evidenciada pelo aumento da reação a TBARS, em animais cronicamente infectados em relação aos animais NI pareados por idade e sexo. O NO é um importante agente tripanossomicida (Silva et al. 2003). No entanto, a persistência de altas concentrações plasmáticas de NO tem sido associada com a gravidade da CCC em pacientes e em modelos experimentais primatas e camundongos da DC (Pérez et al. 2011; Pérez-Fuentes et al. 2003; Carvalho et al. 2012; Pereira et al. 2014a, Pereira et al., 2015a). Estudos indicam que a ação central de ROS levando à destruição oxidativa dos neurônios está associada a transtornos psiquiátricos e comportamentais. (Maes et al. 2000; Valko et al. 2007, Berk et al. 2011; Macêdo et al. 2013). Aumento de mediadores inflamatórios como TNF, NO, entre outros, principalmente desencadeados por agentes infecciosos (como *Mycobacterium* e *T. cruzi*) ou seus produtos, como o LPS, estão envolvidos em alterações do comportamento (Rosenblat et al., 2014; Vilar-Pereira et al., 2012). Além disso, a morte neuronal pode ser o resultado do estresse oxidativo gerado pela disfunção de astrócitos (Abramov et al., 2004). O dano oxidativo é uma característica inicial e comum do mal de Alzheimer, mal de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e outros distúrbios neurodegenerativos (Drechsel et al., 2012). Estados de injúria e/ou inflamação no SNC geralmente ocorre uma série de eventos moleculares, funcionais e morfológicos (Seth & Koul, 2008; Jensen et al. 2013) que culminam, entre outras respostas, na produção de NO. Essa molécula, por sua vez, leva a um

estado de estresse oxidativo, contribuindo para a amplificação e exacerbação de processos neurodegenerativos (Drechsel et al., 2012). De acordo com Navarro e colaboradores (2004) os resultados negativos nos testes de função cognitiva, associados a indicadores de TBARS e às atividades mitocondriais no cérebro indicam uma correlação entre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e diminuição da cognição.

De modo importante, a redução dos níveis plasmáticos de NO e da expressão de iNOS/NOS2 no tecido cardíaco durante a infecção crônica, particularmente após a terapia combinada de Bz com o imunorregulador PTX, não impediu o controle do parasito, embora tenha sido associada à melhora clínica da doença cardíaca (Vilar-Pereira & Pereira et al. 2016). Estes resultados suportam a ideia de que a modulação da produção de NO via regulação de iNOS/NOS2 na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* é um objetivo razoável visando a melhora clínica (Carvalho et al. 2012). No presente estudo, a resposta dos diferentes grupos de tratamento foi muito semelhante após terapia com Bz, PTX, BZ+PTX e Fx. Em todos os grupos foram constatadas diminuições significativas ao teste usando TBARS, tanto no córtex quanto no hipocampo dos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. Os dados sugerem que o tratamento com estes medicamentos foi eficaz na atenuação do dano oxidativo causado pela própria DC, um efeito que foi particularmente importante nas alterações comportamentais na DC crônica. Assim, nossos resultados trazem evidências de que também em uma doença parasitária como a DC deve-se considerar o comprometimento e distúrbios do SNC, numa visão integrada das alterações neuropatológicas (Rossi e Volterra, 2009), como componentes intrínsecos dos processos neurodegenerativos que podem contribuir para alterações comportamentais e desencadeamento/amplificação de doenças crônico-degenerativas.

Os neurônios utilizam o glutamato e o GABA como neurotransmissores. O glutamato é o aminoácido mais abundante do SNC, apresentando funções metabólicas idênticas às exercidas em outros tecidos, preponderantemente biossíntese de proteínas. Além disso, glutamato atua como principal neurotransmissor excitatório. Considera-se também sua participação no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória, na epilepsia, na isquemia neural, na dor neuropática, na ansiedade e na depressão. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC.

Quando este se liga aos receptores, abre-se um canal por onde entra íon cloreto na célula neuronal, fazendo com que a célula fique hiperpolarizada, dificultando a despolarização e, como consequência, dá-se a diminuição da condução neuronal, provocando a inibição do SNC (Haber et al. 2000). O glutamato é o componente essencial para que ocorra a neurotransmissão GABérgica e glutamatérgica. Sob certas condições, como insuficiência na captação de glutamato, introdução de glutamato por outra via, ou despolarização prolongada da terminação nervosa, o glutamato pode se acumular na fenda sináptica e desencadear um processo excitotóxico. Concentrações excitotóxicas de glutamato causam a despolarização excessiva do neurônio pós-sináptico e, conseqüentemente, distúrbios da homeostasia iônica e energética, ativação de enzimas líticas mediada por Ca^{+2} , geração de radicais livres, lesão mitocondrial e edema osmótico, podendo levar à lise celular e morte (Xu et al. 2014).

Nossos dados sugerem que a infecção crônica pelo *T.cruzi* potencializa os efeitos do glutamato e GABA, aumentando os efeitos excitatórios e inibitórios. Mostramos também efeitos neuroprotetores da PTX. Animais cronicamente infectados e tratados com PTX ou a multiterapia Bz+PTX apresentaram diminuição nos níveis de glutamato e GABA nas áreas de córtex e hipocampo, contudo a terapia com Bz não teve efeito em diminuir a concentração de glutamato no córtex cerebral. A PTX atua como inibidor da fosfodiesterase 4, que induz aumento de adenosina monofosfato cíclico, melhorando o fluxo da microcirculação; diminui a migração de neutrófilos; reduz a liberação de citocinas; aumenta a produção de prostaciclina; e reduz a liberação de espécies reativas de oxigênio. Essas propriedades têm sido responsabilizadas pela sua ação de atenuação sobre as lesões de isquemia e reperfusão (Zhang et al. 2005). A PTX tem se mostrado promissora com ação neuroprotetora em diversos estudos de injúrias cerebrais e doenças neurodegenerativas. (Tariq et al. 2008; Cunha et al. 2000). PTX também apresenta propriedades anti-inflamatórias exercendo efeitos inibitórios sobre interleucina-1 β (Sullivan et al. 1988), IL-6 (Schandene et al. 1992), e um efeito inibidor na produção de NO em camundongos monócitos e também, a produção de superóxido. Os mecanismos neuroprotetores desse derivado de xantina ainda não são muito bem conhecidos. O tratamento com PTX foi mostrado anteriormente agir como modulador da expressão de TNFRI

(Mahmoud et al. 2012). De fato, estudo recente no nosso laboratório observou redução nas taxas de infecção de astrócitos favorecida pelo TNF, sugerindo que os efeitos do TNF são via TNFRI (Rodrigues-Silva et al. manuscrito em preparação) Porém, por ser uma droga de ação inibitória sobre o TNF e não causarem os efeitos adversos em demasia e nem apresentarem os custos elevados a PTX pode ser uma nova alternativa terapêutica para inibição da neuroinflamação.

O estresse crônico parece ter grande influência sobre a transcrição de fatores neurotróficos. Os principais componentes dessa família são o fator de crescimento neural NGF e o BDNF. O BDNF importante para o crescimento da célula permite mudanças nas sinapses entre os neurônios (plasticidade sináptica) ao longo da vida, desempenhando um papel importante para a sobrevivência celular (Aan et al. 2009, Leßmann & Brigadski, 2009, Calabrese et al. 2010). Atualmente, o alvo dos novos fármacos está voltado para a cascata de sinalização e na estimulação da produção de fatores neurotróficos, já que existe uma conexão entre as neurotrofinas e transtornos de humor (Hashimoto et al. 2004, Schmidt et al. 2008, Drzyzga et al. 2009). Estudos realizados em tecidos pos-mortem revelaram que a diminuição no nível de BDNF promove perda celular e progressiva redução do volume hipocampal e de estruturas límbicas (Schmidt et al. 2008, Drzyzga et al. 2009) provocando alterações no sistema de memórias em alguns pacientes, bem como vários outros sintomas do transtorno (Aan et al. 2009). A teoria da redução da expressão de fatores neurotróficos, principalmente do BDNF, tem sido fortemente associada no transtorno depressivo e, por isso, seria um alvo da nova classe de medicamentos antidepressivos. Portanto, o tratamento da depressão será direcionado à estimulação da produção de BDNF (Hashimoto et al. 2004, Schmidt et al. 2008). Nesse contexto, nosso estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a expressão de BDNF e GABA e alterações comportamentais no modelo experimental de DC, bem como a forma em que os medicamentos antidepressivos podem estar atuando na estimulação da produção dos fatores neurotróficos.

O BDNF é uma pequena proteína que pertence à família dos fatores neurotróficos, produzido principalmente em neurônios e células da glia (Gómez-Casati et al. 2010). Os níveis de BDNF estão associados com melhor desempenho das funções neuropsicológicas. No entanto, o exato mecanismo

neuroprotetor permanece desconhecido, apesar de ser conhecido seu importante papel na manutenção da plasticidade sináptica (Gunstand et al. 2008). Uma das razões do emprego de BDNF em estudos se deve, não somente à sua participação nos processos de diferenciação, sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica, mas também naqueles envolvendo o aprendizado e a memória (Croll et al. 1998, Li et al. 2009). De fato, os estudos de Erickson e colaboradores (2010), com a participação de 149 participantes, demonstram a ação do BDNF na formação da memória, principalmente na sua potenciação de longa duração (LTP) e na sua persistência, foram observados, baixos níveis de BDNF associados a pior desempenho de memória. Segundo Izquierdo (2002), cerca de 12 horas após a aquisição de uma memória, o BDNF é produzido e liberado no hipocampo. Sem ele, a memória é formada, mas não dura. O BDNF também facilita o fortalecimento das conexões entre neurônios (as sinapses) e, sobretudo, as do hipocampo, córtex e prosencéfalo basal - áreas vitais para a aprendizagem, a manutenção da memória e do pensamento (Tapia-Arancibia et al. 2008). Nossos resultados mostram que a infecção pelo *T. cruzi* leva à diminuição dos níveis de BDNF no córtex e no hipocampo na fase crônica da infecção, possivelmente associado a mecanismos patogênicos próprios desta infecção, porém estes níveis aumentaram, principalmente no córtex de modo significativo, com o uso das intervenções terapêuticas Bz, PTX e Bz+PTX. Devido às evidências do envolvimento do BDNF na neurogênese hipocampal, suas funções e mecanismos de ação têm sido estudados principalmente em patologias associadas ao declínio cognitivo (Karege et al. 2002). No estudo de Harris et al. (2006), os níveis reduzidos de BDNF foram significativamente associado com a disfunção hipocampal e baixa pontuação nos testes de memória e depressão. Tomados em conjunto, estes achados corroboram os nossos dados, no sentido de indicarem o BDNF como um importante biomarcador de mudanças nas habilidades relacionadas à memória. Por estes motivos, o BDNF tem despertado tanto interesse entre aqueles que buscam um maior entendimento dos fenômenos relacionados, particularmente a déficits mnemônicos.

Nossos resultados, como é o caso em investigação, levantam tantas questões quanto às respostas que eles trazem. O que será importante para elucidar agora é, por exemplo, se o efeito da infecção pelo *T. cruzi* sobre o SNC pode diferir entre indivíduos. Fatores-chave podem estar relacionados

com diferenças inerentes à predisposição genética, o estado do sistema imunológico, o tempo de infecção, e/ou parte do SNC afetada. Sob a perspectiva do parasito, fatores-chave podem estar relacionados com a dose, a forma de infecção, o genótipo da cepa infectante, e/ou até mesmo uma interação com outros agentes infecciosos. Assim, trazemos evidências de que também em uma doença parasitária como a DC deve-se considerar o comprometimento neurológico, numa visão integrada das alterações patológicas no SNC, como componentes intrínsecos dos processos neurodegenerativos que podem contribuir para alterações comportamentais e desencadeamento/amplificação de doenças crônico-degenerativas. As análises dos dados obtidos poderão contribuir para a melhor compreensão das alterações comportamentais que influenciam diretamente o desfecho clínico da DC, o que pode impactar de forma positiva no acompanhamento e qualidade de vida dos pacientes.

9. Conclusões

1- Camundongos cronicamente infectados com cepa Colombiana do *T. cruzi* apresentara alterações comportamentais de depressão, ansiedade e memória, reproduzindo aspectos de alterações comportamentais descritas nos portadores crônicos da DC

2- Comportamentos associados à doença (*sickness behavior*) para alterações comportamentais, estão ausentes na infecção experimental da DC, reforçando a existência de depressão e ansiedade no modelo de infecção experimental crônica em camundongos C57BL/6 com a cepa Colombiana pelo *T. cruzi*.

3- A infecção pelo *T. cruzi* interferiu na capacidade mnemônica, pois prejudicou o desempenho dos animais infectados pelo *T. cruzi* em testes específicos.

4- Transtornos de comportamento e alterações cardiovasculares foram observados no modelo experimental sugerindo comorbidade que pode contribuir para diminuir a qualidade de vida do portador crônico.

5- O tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina teve efeito benéfico na ansiedade, reverteu tanto o perfil depressivo como restaurou o comportamento inato compulsivo dos animais, o que é corroborado pela melhora do quadro com o uso do antidepressivo Fx.

6- As alterações cardíacas observadas em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, levam à possibilidade de que as alterações comportamentais possam decorrer destas alterações. Contudo, os resultados com o uso do antidepressivo reforçam a existência de alterações comportamentais de origem neurológica.

7- Intervenções terapêuticas com medicamento tripanossomicida (Bz) e agente imunomodulador (PTX) ou ambas as terapias (Bz+PTX) promoveram efeitos benéficos nas alterações comportamentais e no estresse oxidativo no SNC.

8- Esquemas terapêuticos direcionados ao controle do parasito, reposicionamento da resposta imune, que revertem ou melhoraram alterações comportamentais também ajudaram a restaurar níveis de concentração dos neurotransmissores glutamato e GABA, assim como do fator neurotótico BDNF

9- Em conjunto, estes dados reafirmam o comprometimento do eixo neuro-imune na infecção pelo *T. cruzi*, reforçam a existência da forma nervosa da DC e trazem novas perspectivas terapêuticas para a DC e para doenças crônico-degenerativas com comprometimento comportamental e cognitivo.

10. Limitações e Perspectivas

É preciso admitir que os resultados e análises desta pesquisa suscitaram um número maior de perguntas do que respostas, o que é característico da pesquisa científica. A infecção pelo *T. cruzi* é uma doença parasitária que pode levar ao desenvolvimento de transtornos comportamentais de depressão, ansiedade e déficit mnemônico. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares da resposta imune que ocorrem no SNC, a influência de fatores sistêmicos, neuroimune-endócrinos nestes processos, assim como o entendimento da fisiopatogenia das alterações comportamentais em um cenário inflamatório crônico e/ou na presença de um agente infeccioso, avaliar e testar terapias para as alterações comportamentais com comorbidades como síndrome metabólica, merecem ser devidamente explorados.

De qualquer forma, os resultados aqui contidos e as observações que surgiram dos objetivos estudados, aprofundam a compreensão da existência da forma nervosa na DC. Mas, como toda pesquisa, esta não esgotou o assunto e abre perspectivas para futuros estudos.

11. Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier 545, 2012.

Abrahamsohn IA, Coffman RL. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. 84: 231-244, 1996.

Abramov AY, Canevari L, Duchon MR. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci*. 24: 565-575, 2004.

Abulseoud OA, Foland-Ross L, Bartzokis G, Chang S, Mintz J, Helleman G, Vinters HV. Amygdala astrocyte reduction in subjects with major depressive disorder but not bipolar disorder. *Bipolar Disord*. 12: 541-549, 2010.

Adams GC, Balbuena L, Meng X, Asmundson GJ. Whe social anxiety and depression go together: A population study of comorbidity and associated consequences. *J Affect Disord*. 206: 48-54, 2016

Aebischer J, Cassina P, Otsmane B, Moumen A, Seilhean D, Meininger V, Barbeito L, Pettmann B, Raoul C. IFN γ triggers a LIGHT-dependent selective death of motoneurons contributing to the non-cell-autonomous effects of mutant SOD1. *Cell Death Differ*. 18: 754-768, 2011.

Aggleton JP, Brown MW. Interleaving brain system for episodic and recognition memory. *Science*. 10: 455- 463, 2006.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed 1463, 2004.

Alchieri JC, Cruz RM. *Avaliação Psicológica: conceito, métodos e instrumentos*. São Paulo: Casa do Psicólogo. 128, 2003.

Alencar A, Elejalde P. O sistema nervoso central na infestação experimental do camundongo albino pelo *Schistosomum cruzi*. An Congr Intern Doença de Chagas. 1: 25-34, 1959.

Alencar A, Elejalde P. Histogenesis of the Chagasic granuloma of the CNS of young dogs. Arch Histol Norm Patol. 7: 327-35, 1960.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RJ, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. Infect Immun. 64: 1961-1967, 1996.

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RJ, Silva JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 158: 1433-1440, 2001.

Aliberti JCS, Machado FS, Souto JT, Campanelli AP, Teixeira MM, Gazzinelli RJ, Silva JS. β -chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in mouse inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 67: 4819-4826, 1999.

Altclas J. Chagas' disease after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 18: 447-448, 1996.

Álvarez JM, Fonseca R, Silva HB, Marinho CRF, Bortoluci KR, Sardinha LR, Epiphanyo S, Lima MRD, Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues Mediators of Inflammation. ID 912965: 9, 2014.

Amaral CFS, Tafuri WL, Brener Z. Frequência do parasitismo encefálico em camundongos experimentalmente inoculados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 9: 243-246, 1975.

Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Bahiano. Rev Pathol Trop. 3: 65-121, 1966.

Andrade SG, Carneiro Filho A, de Souza AJ, de Lima ES, Andrade ZA. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. Int J Exp Pathol. 78: 391-399, 1997.

Andrade ZA. Mechanisms of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. Ciba Found Symp. 99: 214-233, 1983.

Antunes AC, Cecchini FM, Bolli FB, Oliveira PP, Reboucas RG, Monte TL, Fricke D. Cerebral trypanosomiasis and AIDS. Arq Neuropsiquiatr. 60: 730-733, 2002.

Arakawa O & Ikeda T. Apomorphine effect on single and paired rat open-field behavior. Physiol Behav, 50:189-94, 1991.

Arankowsky-Sandoval G, Mut-Martín M, Solís-Rodríguez F, Góngora-Alfaro JL, Barrera-Pérez M. Sleep and memory deficits in the rat produced by experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Neurosci Lett. 306: 65-68, 2001.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci. 22: 208-215, 1999.

Araújo SM, Andó MH, Cassarotti DJ, Mota CG, Borges MR, Gomes ML. Programa ACHEI:atenção ao chagásico com educação integral no município de Maringá e região noroeste do Paraná, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 33: 565-572, 2000.

Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Soeiro MN, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequente Chagasic myocarciopathy Cytokine Growth Factor Ver. 19: 405-413, 2008.

Aydemir O, Deveci A, Taneli F. 2005. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 29: 261–265, 2004.

Bacal F, Silva CP, Pires PV, Mangini S, Fiorelli AI, Stolf NG, Bocchi EA. Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant*. 24: 29–34, 2010.

Backes MTS, Rosa LM, Fernandes GCM, Becker SG, Meirelles BHS, Santos SMA. Conceitos de saúde e doença ao longo da história sob o olhar epidemiológico e antropológico. *Revista de Enfermagem. UERJ*. 17: 111-117, 2009.

Banfi C, Sironi L, de Sironi G. Pentoxifylline prevents spontaneous brain ischemia in stroke-prone rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 310: 890-895, 2004.

Bakunina N, Pariante CM, Zunszain PA. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology*. 144: 365–373, 2015.

Banker GA. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science*. 209: 809-810, 1980.

Baptista A. Perturbações do medo e da ansiedade. Uma perspectiva evolutiva e desenvolvimental. In I. Soares (Ed.), *Psicopatologia do desenvolvimento. Trajectórias (in)adaptativas ao longo da vida*. Coimbra: Quarteto. 2000.

Barbeito LH, Pehar M, P. Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estévez AG, Beckman JS. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Rev*. 47: 263-274, 2004.

Barlow DH. *Anxiety and its disorders: the nature and treatment of anxiety and panic*. New York: Guilford. 1988.

Bath KG, Jing DQ, Dincheva I, Neeb CC, Pattwell SS, Chao MV, Lee FS, Ninanl. BDNF Val66Met impairs fluoxetine-induced enhancement of adult hippocampus plasticity. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol*. 37: 1297–1304, 2012.

Bauer ME. Estresse. Como ele abala as defesas do corpo. Ciência Hoje. Instituto de Pesquisas Biomédicas e Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 30: 179, 2002.

Beach SR, Kostis WJ, Celano CM, Januzzi JL, Ruskin JN, Noseworthy PA, Huffman JC. Meta-analysis of selective serotonin reuptake inhibitor-associated QTc prolongation. J Clin Psychiatry. 75:e441-9, 2014.

Belzung C, Billette de Villemeur E. The design of new antidepressants: can formal models help? A first attempt using a model of the hippocampal control over the HPA-axis based on a review from the literature. Behav. Pharmacol. 21: 677–689, 2010.

Bemelmans MH, Abramowicz D, Gouma DJ, Goldman M, Buurman WA. *In vivo* T cell activation by anti-CD3 monoclonal antibody induces soluble TNF receptor release in mice. Effects of pentoxifylline, methylprednisolone, anti-TNF, and anti-IFN γ antibodies. J Immunol. 153: 499-506, 1994.

Benvenuti LA, Rogério A, Nishiya AS, Campos SV, Fiorelli AI, Levi JE. *Trypanosoma cruzi* persistence in the native heart is associated with high-grade myocarditis, but not with Chagas' disease reactivation after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 33: 698-703, 2014.

Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, Dean OM, Giorlando F, Maes M, Yücel M, Gama CS, Dodd S, Dean B, Magalhães PVS, Amminger P, McGorry P, Malhi GS. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. Neurosci Biobehav Rev. 35: 804-817, 2011.

Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. Endocr. Rev. 17: 64–102, 1996.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Nutt D. Introduction to the handbook on fear and anxiety In: Blanchard RJ, Blanchard DC, Griebel G e Nutt D (Ed.). Handbook of anxiety and fear. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2008.

Blanchard C, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25: 205-218, 2001.

Bombeiro AL, D'Império Lima MR, Chadi G, Alvarez JM. Neurodegeneration and increased production of nitrotyrosine, nitric oxide synthase, IFN γ and S100 β protein in the spinal cord of IL-12p40-deficient mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Neuroimmunomodulation.* 17: 67-78, 2010.

Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacol.* 163: 121–141, 2002.

Bourin M, Petit-Demouli te B, Dhonnchadha BN, Hasc et M. Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 21: 567-574, 2007.

Brand o HJS, Zulian R. Nerve cell depopulation in chronic Chagas' disease. A quantitative study in the cerebellum. *Rev. Inst. Med. Trop. S o Paulo.* 8: 281-286, 1966.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 103-110, 1997. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature reviews Neuroscience.* 10: 519-29, 2009.

Bruno RB, Mancuso C, Calvani M. Pentoxifylline treatments improves neurological and neurochemical deficits in rats subjected to transient brain ischemia. *Brain Research.* 1260: 55-64, 2009.

Cahill L. The neurobiology of emotionally influenced memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 125: 238-45, 1995a.

Calabrese F, Molteni R, Cattaneo A, Macchi F, Racagni G, Gennarelli M, Ellenbroek BA, Riva MA. Long-Term duloxetine treatment normalizes altered brain-derived neurotrophic factor expression in serotonin transporter knockout rats through the modulation of specific neurotrophin isoforms. *Mol Pharmacol.* 77: 846-53, 2010.

Calvo-Romero JM, Soria-Pantoja RJ, Garcia JDA. Electrocardiographic abnormalities in subarachnoid hemorrhage. *Rev Neurol.* 6: 536-7, 2001.

Camarrota M.; Bevilaqua, L.R.; Vianna, M.R.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. The extinction of conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use. *Rev. Bras. Psiquiatria.* 29: 80-5, 2007.

Campos JC. Radioautographic study of the protein synthesis in the Purkinje cells at the acute phase of the experimental *Trypanosomiasis cruzi* in rats. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1: 25-33, 1969.

Capuron L, Andrew HM. Immune System to Brain Signaling: Neuropsychopharmacological Implications *Pharmacol Ther.* 130: 226-238, 2011.

Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma-interferon and interleukin-10: role of NK cells. *Infect Immun.* 64: 128-134, 1996.

Cardoso SM, Pereira C, Oliveira R. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 26: 3-13, 1999.

Carobrez AP & Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:1193-1205, 2005.

Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol.* 9: 533-42, 2010.

Carod-Artal FJ, Vargas AP, Falcão T. Stroke in asymptomatic Trypanosoma cruzi-infected patients. *Cerebrovasc Dis.* 31: 24-8, 2011.

Carroll-Anzinger D, Al-Harhi L. Gamma Interferon Primes Productive Human Immunodeficiency Virus Infection in Astrocytes. *J Virol.* 80: 541-544, 2006.

Carvalho CM, Silverio JC, Silva AA, Pereira IR, Coelho JM, Britto CC, Moreira OC, Marchevsky RS, Xavier SS, Gazzinelli RT, Bonecini-Almeida MG, Lannes-Vieira J. Induzível óxido nítrico sintase em tecido cardíaco e óxido nítrico no soro de Trypanosoma macacos rhesus infectados com *T.cruzi*: associação com lesão cardíaca. e1644 *PLoS negl Trop Dis.* 2012.

Castaneda AE, Tuulio-Henriksson A, Marttunen M, Suvisaari J, Lönnqvist JA. Review on cognitive impairments in depressive and anxiety disorders with a focus on young adults. *J Affect Disord.* 106: 1-27, 2008.

Castillo MD, Mendoza G, Oviedo J, Bianco RPP, Anselmo AE, Silva M. AIDS and Chagas'disease with central nervous system tumor-like lesion. *Am. J. Med.* 88: 693-694, 1990.

Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem Int Oswaldo Cruz.* 1: 159-218, 1909.

Chagas C. Nova entidade morbida do homem: resumo geral de estudos etiolojicos e clínicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 3: 219-275, 1911.

Chagas C, Villela E. Forma Cardíaca de Trypanosomíase Americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 14: 5-61, 1922.

Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen G.M, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry.* 50: 260–265, 2001.

- Chieff PP. Parasitoses e alterações comportamentais. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo. 60: 76-84, 2015.
- Chun MM, Turk-Browne NB. Interactions between attention and memory. Curr Opin Neurobiol. 17: 177-84, 2007.
- Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor- α production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN γ , and IL-1 β . J Immunol. 144: 2999-3007, 1990.
- Cordova E, Boschi A, Ambrosioni J, Cudos C, Corti M. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007. Int J Infect Dis. 12: 587-592, 2008.
- Córdova E, Maiolo E, Corti M, Orduña T. Neurological manifestations of Chagas' disease. Neurol Res. 32: 238-244, 2010.
- Corrêa FM, Chieffl PP, Lescano SAZ, Santos SV. Behavioral and memory changes in *Mus musculus* coinfecting by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 56: 353-356, 2014.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed- a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102: 113-22, 2007.
- Cruz A P M, Frei F e Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav. 49:171-176, 1997.
- Cryan JF, Lucki I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine (2C) receptors. J Pharmacol Exp Ther. 295: 1120-6, 2005.
- Crocker SJ, Frausto RF, Whitton JL, Milner R. A novel method to establish microglia-free astrocyte cultures: comparison of matrix metalloproteinase expression profiles in pure cultures of astrocytes and microglia. Glia. 56: 1187-1198, 2008.
- Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. Brain Res. 23: 200-208, 1998.

Cunha GMA, Bezerra PJP, Saldanha MDD, Vianna GSB. Pentoxifyline improved learning and memory in glutamate-lesioned rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 6: 687-694, 2000.

Da Cunha F, Soares MS, de Sá B, Lira LCF, Darío L, Celina M, Javier S, Javier C. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas; *Associação Médica de Brasília; Brasília Medica.* 49: 1-7, 2013.

Da Mata JR, Camargos ERS, Chiari E, Machado CRS. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Res Bull.* 53: 153-162, 2000.

Da-Cruz AM, Igreja RP, Dantas W, Junqueira AC, Pacheco RS, Silva-Goncalves AJ, Pirmez C. Long-term follow-up of co-infected HIV and *Trypanosoma cruzi* Brazilian patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 98: 728-733, 2004.

Dantzer R, Kelley KW. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun.* 21: 153-160, 2007.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9: 46-56, 2008.

Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW. Inflammation associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology.* 36: 426-36, 2011.

De Queiroz AC. Tumor-like lesion of the brain caused by *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 22: 473-476, 1973.

Dean B. Understanding the role of inflammatory-related pathways in the pathophysiology and treatment of psychiatric disorders: evidence from human

peripheral studies and CNS studies. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 997–1012, 2011.

D'Mello C, Tai L, Mark GS. Cerebral Microglia Recruit Monocytes into the Brain in Response to Tumor Necrosis Factor Signaling during Peripheral Organ Inflammation. *The Journal of Neuroscience.* 29: 2089 –2102, 2009.

De Sousa AS, Xavier SS, de Freitas GR, Hasslocher-Moreno A. Prevention Strategies of Cardioembolic Ischemic Stroke in Chagas' Disease *Arq Bras Cardiol.* 91: 280-284, 2008.

De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. 1: 3, 2002.

De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol.* 2010.

Del Castillo M, Mendoza G, Oviedo J, Perez BRP, Anselmo AE, Silva M. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *Am J Med.* 88: 693-694, 1990.

Dere E, Huston JP, De Souza MAS. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 31: 673-704, 2007.

Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 121: 66-72, 1995.

Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L. Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108: 18126-18131, 2011.

Dix SL & Aggleton JP. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res.* 99: 191-200, 1999.

Dong Y, Benveniste EN. Immune Function of Astrocytes. *Glia.* 36: 180-190, 2001.

dos Santos PVA, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* 3: 971-984, 2001.

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctot KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* 67: 446–457, 2010.

Drechsel DA, Estevez AG, Barbeito L, Beckman JS. Nitric Oxide-Mediated Oxidative Damage and the Progressive Demise of Motor Neurons in ALS. *Neurotox Research.* 22: 251-264, 2012.

Drzyzga LR, Marcinowska A, Obuchowicz E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of depressants. *Brain Res Bull.* 79: 248-257, 2009.

Du F, Qian ZM, Zhu L, Wu XM, Qian C, Chan R, Ke Y. Purity, cell viability, expression of GFAP and bystin in astrocytes cultured by different procedures. *J Cell Biochem.* 109: 30-37, 2010.

Du B, Tang X, Liu F, Zhang C, Zhao G, Ren F, Leng X. Antidepressantlike effects of the hydroalcoholic extracts of *Hemerocallis citrina* and its potential active components. *BMC Complement Altern Med.* 14: 326, 2014.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 54: 597–606, 1997.

Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 21: 581-587, 2005.

Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 21: 287-292, 2008.

Duvarci S, Pare D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 27: 4482–4491, 2007.

Edgcomb JH, Walker DH, Johnson CM Pathological features of *Trypanosoma cruzi* infections of *Rattus rattus*. *Arch Pathol.* 96: 36-38, 1973.

Elejalde P. Morphological pathology of Chagas' acute meningoencephalitis. *Arch Histol Norm Patol.* 7:273-80,1960.

Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 8: 203-214, 1985.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav Brain Res.* 31: 47-59, 1988.

Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Molly M, Pence M, A JW. BDNF is Associated With Age-Related Decline in Hippocampal Volume *J Neurosci.* 30: 5368–5375, .2010.

Eun BL, Liu XH, Barks JD. Pentoxifylline attenuates hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Pediatric Res.* 47: 73-78, 2000.

Falsig J, Porzgen P, Lund S, Schratzenholz A, Leist M. The inflammatory transcriptome of reactive mouse astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem.* 96: 893-907, 2006.

Fava M: Weight gain and antidepressants. *J Clin Psychiatry.* 61: 37-41, 2000.

Fekadu A, Shibre T, Cleare AJ. Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders-overview of evidence and mechanisms. *Folia Parasitol (Praha)*. 57 :105-13, 2010

Felger JC, Alagbe O, Hu F, Mook D, Freeman A.A, Sanchez .M, Kalin NH, Ratti E, Nemeroff CB, Miller AH. Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression. *Biol. Psychiatry*. 62: 1324–1333, 2007.

Ferrari AJ, Charlson FJ, Patten SB, Whiteford HA. The epidemiological modelling of major depressive disorder: application for the Global Burden of Disease Study. *Plos One* 8, e69637, 2013.

Ferreira MS, Nishioka Sde A, Rocha A, Silva AM, Ferreira RG, Olivier W, Tostes Junior S. Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophiliac patient. *Am J Trop Med Hyg*. 45: 723-727, 1991.

Ferreira MS. Chagas disease and immunosuppression. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1: 325-327, 1999.

Ferreira RTB, Branquinho MR, Leite PC. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí: a challenge for Health Surveillance. *Vig Sanit Debate*. 2: 4-11, 2014.

Fields RD. A outra metade do cérebro. *Sci. American Brasil*. 24: 46-53, 2004.

Fitzgerald KT, Bronstein AC. Selective serotonin reuptake inhibitor exposure. *Top Companion Anim Med*. 28: 13-17, 2013.

Fnu N, Fabiana SM, Barbara AB, Linda AJ, Philipp ES, Shankar M, Michael PL, Louis MW, Nisha JG, Herbert BT. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease *Cell Microbiol*. May. 14: 634–643, 2012.

Fonseca, A. Riscos e desafios na infância e na adolescência – problemas de ansiedade em crianças e adolescentes. Em A. Fonseca (Eds.), Crianças e adolescentes: uma abordagem multidisciplinar. Coimbra: Edições Almedina, SA. 501-540, 2010.

Forés R, Sanjuán I, Portero F, Ruiz E, Regidor C, López-Vélez R, Linares M, Gil S, Ojeda E, Krsnik I, Bautista G, Vallejo C, García-Marco J, Fernández MN, Cabrera JR. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. Bone Marrow Transplant. 39: 127-128, 2007.

Fortin NJ, Wright SP, Eichenbaum H. Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. Nature. 5:188-91, 2004.

Francisco NM, Hsu NJ, Keeton R, Randall P, Sebesho B, Allie N, Govender D, Quesniaux V, Ryffel B, Kellaway L, Jacobs M. TNF-dependent regulation and activation of innate immune cells are essential for host protection against cerebral tuberculosis. J Neuroinflammation. 12: 125-126, 2015.

Freeman MR. Specification and morphogenesis of astrocytes. Science. 330: 774-778, 2010.

Frenois F, Moreau M, O'Connor J, Lawson M, Micon C, Lestage J, Kelley KW, Dantzer R, Castanon, N. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallels the expression of depressive-like behavior. Psychoneuroendocrinology. 32: 516–531, 2007.

Fu YY, Zhang F, Zhang L, Liu HZ, Zhao ZM, Wen XR, Wu J, Qi DS, Sun Y, Du Y, Dong HY, Liu YH, Song YJ. Mangiferin regulates interleukin-6 and cystathionine-b-synthase in lipopolysaccharide-induced brain injury. Cell Mol Neurobiol. 34: 651-657, 2014.

Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. Treatment

with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.*;49:1521-8, 2005.

Gardner A & Boles RG. Beyond the serotonin hypothesis: Mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 35: 730–743, 2011.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 22: 2501-2506, 1992.

Gazzinelli RT, Talvani A, Camargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LQ, Martins GA, Aliberti JC, Silva JS. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Braz J Med Biol Res.* 31: 89-104, 1998.

Gerbasi SI & Costa PJ. As transformações da memória: articulações entre Sigmund Freud e Eric Kandel (As transformações da memória) *Avances en Psicología Latinoamericana / Bogotá (Colombia).* 33: 77-89 / 2015.

Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC. Immune Privilege as an Intrinsic CNS Property: Astrocytes Protect the CNS against T-Cell-Mediated Neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* 320519, 2013.

Gluckstein D, Ciferri F, Ruskin J.. Chagas' disease: another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 92: 429-32, 1992.

Goldstein DS. The electrocardiogram in stroke: relationship to pathophysiological type and comparison with prior tracings. *Stroke.* 10: 253-9, 1979.

Goldstein LB. Guidelines for the primary prevention of stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American stroke Association. *Stroke*. 42: 517-84, 2011.

Gómez-Casati ME, Murtie JC, Rio C, Stankovic K, Liberman MC, Corfas G. Células não neuronais regulam a formação de sinapses no epitélio sensorial vestibular via expressão BDNF erbB-dependente. *Proc Natl Acad Sci US A*. 107: 17005-10, 2010.

Gontijo ED, Rocha OMC & Oliveira UT. Perfil clínico-epidemiológico de chagásicos atendidos em ambulatório de referência e proposição de modelo de atenção ao chagásico na perspectiva do SUS. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 29, 101-108, 1996.

Gordon JÁ, Hen R. Genetic approaches to the study of anxiety. *Annu Ver Neurosci*. 27: 193-222. 2004.

Grabowski R S *Princípios de Anatomia e Fisiologia*, Ed Guanabara Koogan, 9ª edição, Rio de Janeiro – RJ, 2008.

Graeff FG. Brain defence systems and anxiety. In: Roth G, Burrows GD, Noyes R (Eds). *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier. 3: 307-57, 2005.

Graeff FG & Guimarães ML. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 4ª Edição. São Paulo: Editora Lemos. 188, 2000.

Gray JA. *The neuropsychology of anxiety: an enquire into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford: Oxford University Press. 1982.

Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*. 212, 56-58, 1981.

Griffiths DP, Clayton NS. Testing episodic memory in animals: A new approach. *Physiology & Behavior*. 73: 755– 762, 2001.

Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 817-827, 1997.

Grillon C. Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 3:421-437, 2008.

Guedes PM, Silva GK, Gutierrez FR, Silva JS. Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 9: 609-20, 2011.

Guimarães PM. Suicide risk and alcohol and drug abuse in outpatients with HIV infection and Chagas disease. *Rev Bras Psiquiatr*. 36: 131-7, 2014.

Guyton M D; Hall Ph D; *Tratado de Fisiologia Médica*, Ed, Elsevier, Rio de Janeiro - RJ, 2006.

Haber SN. Neurotransmitters in the human and nonhuman primate basal ganglia. *Hum Neurobiol*. 5: 159-68, 2000.

Hall CS. Emotional behavior in the rat: defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol*. 18: 385-403, 1941.

Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press: UK. 2002.

Hamby ME, Hewett JA, Hewett SJ. TGF-beta1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia*. 54: 566-577, 2006.

Handley SL, McBlane JW, Critchley MAE, Njunge K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res*. 58: 203-210, 1993.

Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 40: 140-155, 2002.

Haroon E, Charles LR and Andrew HM. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior Neuropsychopharmacology REVIEWS. 37: 137–162, 2012.

Harrison PJ. The neuropathology of primary mood disorder. *Brain*. 125: 1428-1449, 2002.

Hart BL. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12: 123–137, 1988.

Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Ver.* 45 :104-14, 2004.

He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 661-665, 2007.

Henriquez SA, Brett R, Alexander J, Pratt J, Roberts CW. Neuropsychiatric Disease and *Toxoplasma gondii* Infection Neuroimmunomodulation. 16:122–133, 2009.

Herting G, Axelrod J, Whitby LG. Effect of drugs on the uptake and metabolism of H3-norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 134, 146–153, 1961.

Hertz L, Peng L, Lai JC. Functional studies in cultured astrocytes. *Methods.* 16: 293-310, 1998.

Hirashima Y, Takashima S, Matsumura N. Right sylvian fissure subarachnoid hemorrhage has electrocardiographic consequences. *Stroke.* 32: 2278-81, 2001.

Hochstrasser B, Isaksen PM, Koponen H, Lauritzen L, Mahnert FA, Rouillon F, Wade AG, Andersen M, Pedersen SF, Swart JC, Nil R Prophylactic effect of

citalopram in unipolar, recurrent depression: placebo-controlled study of maintenance therapy. *Br J Psychiatry*. 178: 304-10, 2001.

Hoffman EJ, Mathew SJ. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. *Mt Sinai J Med*.75: 248-62, 2008.

Hohoff C. Anxiety in mice and men: a comparison. *J Neural Transm*. 6:679-687, 2009.

Hopkings SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition., *Trends Neurosci*. 18: 83-88, 1995.

Hotzheimer PE, Nemeroff CB. Advances in the treatment of depression. *J Neuro*. 3: 42-56, 2006.

Hopkins SJ. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural hormonal collaboration. *Acta Biomed*. 78:231-247, 2007.

Horvath TL Synaptic Plasticity in Energy Balance Regulation *OBSOITY* Vol. 14 Supplement August 2006

Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt Cravioto M, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, Meymandi S, Karunakara U, Ribeiro I, Cohen RM, Pecoul B. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. *PLoS Negl Trop Dis*. 7: e2300, 2013.

Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci Res*. 68: 261-75, 2010.

Howren MB, Lamkin DM, Suls J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom. Med*. 71: 171–186, 2009.

Hueb MFD, Loureiro SR. Revisão: aspectos cognitivos e psicossociais associados a doença de Chagas. *Psicol Estud*. 10: 137-42, 2005.

Hunter CA, Jennings FW, Kennedy PG, Murray M. Astrocyte activation correlates with cytokine production in central nervous system of *Trypanosoma brucei brucei*-infected mice. *Lab Invest.* 67: 635-642, 1992.

Huot ME, Mazroui R, Leclerc P, Khandjian EW. Developmental expression of the fragile X-related 1 proteins in mouse testis: association with microtubule elements. *Hum Mol Genet.*24: 2803-11, 2001.

Ihrle RA, Alvarez-Buylla A. Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res.* 331: 179-191, 2008.

Izquierdo I. *Memória.* Artmed. Porto Alegre, 2002.

Izquierdo, I. *Memória (2a ed.).* Porto Alegre: Artmed, 2011.

Izquierdo I, Medina J. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.*103: 1-11, 1999.

Jacob S., Francone, C., & Lossow, W. *Anatomia e Fisiologia Humana (5ª ed.).* Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1990.

Jardim E. Alterações quantitativas das células de Purkinje na fase aguda da moléstia de Chagas experimental no camundongo. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* (São Paulo). 25:199-108, 1967.

Jaykaran L, Bhardwaj P, Kantharia ND, Yadav P, Panwar A. Effect of fluoxetine on some cognitive functions of patients of depression. *Indian J Psychol Med.*31: 24-9, 2009.

Jensen CJ, Massie A, De Keyser J. Immune Players in the CNS: The Astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol.* 8: 824–839, 2013.

Jeon SW, Kim YK. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World J Psychiatry.* 6: 283-93, 2016.

Jones EM, Colley DG, Tostes LER, Venencab-Jones MC, Curley TL. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 48: 348-357, 1993.

Jörg ME, Freire RS, Orlando AS, Bustamante AG, Figueredo RC, Peltier YA, Oliva R. Disfunción cerebral mínima como secuela de meningoencefalitis aguda por *Trypanosoma cruzi*. *Prensa Médica Argentina*, 59, 1658-1669, 1972.

Jörg M, Rovira IZ. Formas encefalopáticas de enfermedad de Chagas crônica observadas en Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 67: 353-360, 1981.

Jörg M, Storino R, Sapino RV. Participación encefalopática em la enfermedad de Chagas crónica. Reflexiones derivadas de experiencia personal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 27: 31-37, 1994.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Molecular Medicine*. 12, article e29, 2010.

Kandel ER & Hawkins RS. The biological basis of learning and individuality. *Sci Am*. 267:78-86, 1992.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Princípios da neurociência*. 4.ed. Barueri - SP: Manole. 5-17, 2003.

Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 136: 29–37, 2005.

Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleskaya N, Agustsdottir A, Antila H, Popova D, Akamine Y, Bahi A, Sullivan R, Hen R,

Drew LJ, Castren E. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science*. 334: 1731–1734., 2011.

Kaster MP, Gadotti VM, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology*. 62: 419-426, 2012.

Kaushik M, Poppy H.L. Lamberton, Joanne P. Webster The role of parasites and pathogens in influencing generalised anxiety and predation-related fear in the mammalian central nervous system. *Hormones and Behavior*. 62: 191-201, 2012.

Kettenmann H, Ransom BR *Neuroglia*. New York. Oxford University Press. 1995.

Kiecolt-Glaser JK, Loving TJ, Stowell JR, Malarkey WB, Lemeshow S, Dickinson SL, Glaser R. Hostile marital interactions, proinflammatory cytokine production, and wound healing. *Arch. Gen. Psychiatry*. 62: 1377–1384, 2005.

Kim JH, Min KJ, Seol W, Jou I, Joe EH. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *J Neurochem*. 115: 2010.

Kimelberg HK. The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*. 45: 191-202, 2004.

Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist*. 16: 79-106, 2010.

Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol*. 100: 307-317, 2006.

Kopelnik A, Zaroff JG. Neurocardiogenic injury in neurovascular disorders. *Crit Care Clin*. 22:733–52, 2006.

Koppula S, Kumar H, More SV, Kim BW, Kim IS, Choi DK. Recent advances on the neuroprotective potential of antioxidants in experimental models of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci.* 13: 10608-10629, 2012.

Kornstein SG, Bose A, Li D, Saikali KG, Gandhi C. Escitalopram maintenance treatment for prevention of recurrent depression: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 67: 1767-75, 2006.

Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature.* 445: 894–902, 2008.

Kroll-Palhares K, Silvério JC, Silva AA, Michailowsky V, Marino AP, Silva NM, Carvalho CM, Pinto LM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103: 375-385, 2008.

Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek PC, Pawlik MW, Pawlik WW, Kwiecień N, Konturek SJ. Gastroprotection by pentoxifylline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol.* 55: 337-55, 2004.

Lambrecht FL. Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 7: 346-352, 1965.

Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Soeiro Mde N, Gadelha P, Corrêa-Oliveira R. The centennial of the Discovery of Chagas disease: facing the current challenges. *Plos Negl Trop Dis.* 4: e645, 2010.

Lapin IP, Oxenkrug GF. Intensification of the central serotonergic processes as a possible determinant of the thymoleptic effect. *Lancet.* 1: 132–136, 1969.

Lapmanee S, Charoenphandhu J, Charoenphandhu N. Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety- and depression-like behaviors. *Behav Brain Res.* 50: 316-25, 2013.

Laranja FS, et al. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* 14:1035-1060,1956.

Laureys G, Gerlo S, Spooren A, Demol F, De Keyser J, Aerts JL. β_2 -adrenergic agonists modulate TNF- α induced astrocytic inflammatory gene expression and brain inflammatory cell populations. *J Neuroinflammation.* 11: 21, 2014.

Leßmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neurosci Res.* 65: 11-22, 2009.

LeDoux, J.E., Iwata, J., Cicchetti, P., Reis, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J. Neurosci.* 8: 2517–2529, 1988.

Lee S, Jeong J, Kwak Y, Park SK. Depression research: where are we now? *Mol Brain.* 3: 8, 2010.

Lent, Roberto. Fundamentos da Neurociência. In LENT, Roberto. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência São Paulo: Atheneu. 2, – 26, 2004.

Li X, Morrow D, Witkin JM. Decreases in nestlet shredding of mice by serotonin uptake inhibitors: comparison with marble burying. *Life Sci.* 78:1933–1939, 2006.

Li W, Henderson LJ, Major EO, Al-Harhi L. IFN γ mediates enhancement of HIV replication in astrocytes by inducing in antagonist of the b-catenin pathway (DKK1) in a STAT 3-dependent manner. *J Immunol.* 186: 6771–6778, 2011.

Li G, Peskind ER, Millard SP, Chi P, Sokal I, Yu CE, Bekris LM, Raskind MA, Galasko DR, Montine TJ. Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS One*. 4: e5424, 2009.

Libonatti E, Maglio F. Manifestações neurológicas agudas na Doença de Chagas Mazza. *Rev Neurol Arq*. 3: 420-424, 1977.

Lim DA, Alvarez-Buylla A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulate neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 7526-7531, 1999.

Lima-Costa MF, Castro-Costa E, Uchôa E, Firmo J, Ribeiro AL, Ferri CP, et al. A population-based study of the association between *Trypanosoma cruzi* infection and cognitive impairment in old age (The Bambuí Study). *Neuroepidemiology*. 32:122-8, 2009.

Linares M, Marín-García P, Pérez-Benavente S, Sánchez-Nogueiro J, Puyet A, Bautista JM, Diez A. Brain-derived neurotrophic factor and the course of experimental cerebral malaria. *Brain Res*. 1490: 210-24, 2013.

Lipkind D, Sakov A, Kafkafi N, Elmer GI, Benjamini Y e Golani I. New replicable anxiety-related measures of wall vs center behavior of mice in the open field. *J Appl Physiol*. 97: 347-359, 2004.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92: 180–185, 1990.

Liu Y, Liu H, Kim BO, Gattone VH, Li J, Nath A, Blum J, He JJ. CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol* 78: 4120-4133, 2004.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 25: 402-408, 2001.

Livramento JA, Machado LR, Spina-França A. Cerebrospinal fluid abnormalities in 170 cases of AIDS. *Arq Neuropsiquiatr.* 47: 326-31, 1989.

Ma XC, Jiang D, Jiang WH, Wang F, Jia M, Wu J, Hashimoto K, Dang YH, Gao CG. Social isolation-induced aggression potentiates anxiety and depressive-like behavior in male mice subjected to unpredictable chronic mild stress. *PLoS One.* 2011.

Macêdo DS, David F, de Lucena C, Ana Isabelle G, Queiroz B, Rafaela C, Cordeiro B, Maíra M, Araújo B, Francisca CS, Silvânia M, Vasconcelos B, Thomas N, Hyphantis D, João Quevedo E, Roger S, McIntyre FG, André F, Carvalho. Effects of lithium on oxidative stress and behavioral alterations induced by lisdexamfetamine dimesylate: Relevance as an animal model of mania *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 43: 230–23, 2013.

McGaugh JL. Making lasting memories: remembering the significant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 :10402-10407, 2013.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 102: 3003-3008, 2000.

Maes M, De Vos N, Pioli R, Demedts P, Wauters A, Neels H, Christophe A. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. *Journal of Affective Disorders.* 58: 241-246, 2000.

Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, Kubera M, Bob P, Lerer B, Maj M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis.* 24: 27-53, 2009.

Maes M, Leonard BE, Myint AM, Kubera M, Verkerk R. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine

2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35:702-21, 2011.

Mangone CA, Sica RER, Pereyra S, Genovese O, Sanz OP, Segura M. Cognitive impairment in human chronic Chagas' disease. *Arq Neuropsiq*. 52, 200-203, 1994 a.

Mahmoud MF, El Shazly SM, Barakat W. Inhibition of TNF- α protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via NF- κ B dependent pathway. *Naunyn Schmiedebergs. Arch Pharmacol*. 385: 465-471, 2012.

Marchi R, Gurgel CBFM & Blatt AM. Depressão e doença de Chagas: um estudo preliminar do estado emocional em pacientes chagásicos. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. 47: 461-463, 1998.

Manji HK, Drevets WC, Charney DS.. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. 7: 541-547, 2001.

Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AV. Forma crônica cardíaca. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 266-96, 2000.

Marino AP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation*. 110: 1443-1449, 2004.

Martins GA, Cardoso MA, Aliberti JC, Silva JS. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol. Lett*. 63: 113-20, 1998.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *J Infect Dev Ctries*. 6: 817-824, 2012.

Matsumura K, Kobayashi S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. *Frant Biosci*. 9: 2819-2826, 2004.

Mavrides N & Nemeroff C. Treatment of affective disorders in cardiac disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 17:127-40, 2015.

Medeiros GA, Silvério JC, Marino AP, Roffê E, Vieira V, Kroll-Palhares K, Carvalho CE, Silva AA, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbes Infect*. 11: 264–273, 2009.

Meeuwssen S, Persoon-Deen C, Bsibsi M, Ravid R, van Noort JM. Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia*. 43: 243-53, 2003.

Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Júnior WO, Gomes Y, Britto C. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors*. 8:154–160, 2015.

Mhatrea M, Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets. *J Alzheimers Dis*. 6: 147-157, 2004.

Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. 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*. 159: 1723-1733, 2001.

Miller WR. Psychological deficit in depression. *Psychological Bulletin*. 82:

238-260, 1975.

Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 272: 819-821.

Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol. Psychiatry*. 65: 732–741, 2009.

Miller AH. Depression and immunity: a role for T cells? *Brain Behav Immun*. 24: 1-8, 2010.

Miller JF, Neufang M, Solway A, Brandt A, Trippel M, Mader I, Hefft S, Merkow M, Polyn SM, Jacobs J, Kahana MJ, Schuize-Bonhage A. Neural Activity in Human Hippocampal Formation Reveals the Spatial Context of Retrieved Memories. *Science*. 342: 1111-1114, 2013.

Ming M, Ewen ME, Pereira ME. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*. 82: 287-296, 1995.

Mitchell JB, Laiacóna J. The medial frontal cortex and temporal memory: Tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behavioural Brain Research*. 97: 107–113, 1998.

Moncada GB, Romero J, Espinoza E, Leal FM. Desarrollo mental en niños con infección chagásica crónica *Arch Venez Pueric Pediatr*. 50: 106-110, 1987.

Montgomery K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 4: 254-260. 1958.

Moreira MB; Medeiros CA. *Princípios básicos de Análise do Comportamento*. Porto Alegre: Artmed. 2007.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velázquez E, Bonilla L, Meeks

B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S., BENEFIT Investigators. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1507574, 2015.

Mosquera JE, Herrera A. Experimental chagas encephalitis. (preliminary report) *Rev Fac Cienc Med Cordoba.* 23: 25-28,1965.

Morocoima A, Socorro G, Avila R, Hernández A, Merchán S, Ortiz D, Primavera G, Chique J, Herrera L, Urdaneta-Morales S. *Trypanosoma cruzi* experimental parasitism in the central nervous system of albino mice. *Parasitol Rev.* 111: 2099-2107, 2012.

Mosovich AS, et al. Chagas Disease as a mechanistic model for testing a novel hypothesis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41: 70-72, 2008.

Movassaghi S, Sharifi ZN, Soleimani M, Joghatan MT, Mehdizedeh M. Effects of Pentoxifylline on ischemia-induced brain damage and spatial memory impaired in rat. *Iranian J B M Science.* 3: 731-739, 2012.

Mota DCGD, Benevides-Pereira AMT, Gomes ML, Araújo SM. Estresse e resiliência em doença de Chagas. *Aletheia.* 24: 57-68, 2006.

Moutier CY, Stein MB. The history, epidemiology, and differential diagnosis of social anxiety disorder. *J Clin Psychiatry.* 9: 4–8, 1999.

MS, Ministério da Saúde [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/consenso chagas. 2005.](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/consenso_chagas.2005)

MS, Ministério da Saúde [http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2011/matriz.htm. 2011.](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2011/matriz.htm.2011)

MS, Ministério da Saúde [http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2011/matriz.htm. 2015.](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2011/matriz.htm.2015)

Mululo SCC; Menezes GB; Vigne P; Fontenelle LF. A review on predictors of treatment outcome in social anxiety disorder. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 34: 92-100, 2012.

Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia*. 29: 1-13, 2000.

Ngasala BE, Malmberg M, Carlsson AM, Ferreira PE, Petzold MG, Blessborn D, Bergqvist Y, Gil JP, Premji Z, Mårtensson A. Effectiveness of artemether-lumefantrine provided by community health workers in under-five children with uncomplicated malaria in rural Tanzania: an open label prospective study. *Malar J*. 10: 64, 2011.

Nahid P, Daley CL. Prevention of tuberculosis in HIV-infected patients. *Curr Opin Infect Dis*. 19: 189-93, 2006.

Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286: 505-511, 2004.

Nestler EJ. Neurobiology of depression. *Neuron*. 34: 13-25, 2002.

Nezafati MH, Vojdanparast M, Nezafati P. Antidepressants and cardiovascular adverse , events: A narrative review. *Atheroscler*. 11:5, 2015.

Nguyen VT, Benveniste EM. Critical role of tumor necrosis factor- α and NF- κ B in interferon- γ -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem*. 277: 13796-13803, 2002.

Nutt DJ. Generalized anxiety disorder: a comorbid disease. *Eur Neuropsychopharm*. 16: 109–18, 2006.

Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm*: 861231, 2014.

Otsmane B, Aebischer J, Moumena A, Raoul C. Cerebrospinal fluid-targeted delivery of neutralizing anti-IFN γ antibody delays motor decline in an ALS mouse model. *Neuroreport*. 25: 49-54, 2013.

Ozaki Y, Guariento ME, de Almeida EA. Quality of life and depressive symptoms in Chagas disease patients. *Qual Vida Res.* 20: 133-8. 2011.

Painsipp E, Köfer MJ, Sinner F, Holzer P. Prolonged depression-like behavior caused by immune challenge: influence of mouse strain and social environment. *PLoS One.* 2011.

Paiva CN, Bozza, MT. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxid Redox Signal.* 20:1000-1037, 2014.

Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, Mesquita J, Fortes GB, Figueiredo RT, Souza HS, Fantappiè MR, Lannes-Vieira J, Bozza MT. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest.* 122: 2531-2542, 2012.

Paiva CN, Figueiredo RT, Kroll-Palhares K, Silva AA, Silvério JC, Gibaldi D, Pyrrho Ados S, Benjamim CF, Lannes-Vieira J, Bozza MT. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol.* 86: 1239-1246, 2009.

Pardo JV, Pardo PJ, Humes SW, Posner M. Neurocognitive dysfunction in antidepressant-free, non-elderly patients with unipolar depression: alerting and covert orienting of visuospatial attention. *J Affect Disord.* 92: 71-78, 2006.

Pariante CM, Everall IP. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull.* 55: 585-595, 2001.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA, Moreira OC, Britto C, Sarmiento EDM, Lannes-Vieira J. Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease. *Mediators Inflamm in press.* 2014a.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA, Lannes-Vieira J. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumor necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109: 289-298, 2014b.

Pereira IR. Pentoxifylline reverses chronic experimental Chagasic cardiomyopathy in association with repositioning of abnormal CD8+ T-cell response. *PLoS Negl Trop Dis.* e0003659, 2015a.

Pereira IR et al. A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* e1004594, 2015b.

Pereyra, S. Rastreo cognitivo en pacientes con enfermedad de Chagas en estado crónico: estudio preliminar. *Rev Neurol Argent.* 17: 37-40, 1992.

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

Pérez-Fuentes R, Guégan JF, Barnabé C, López-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Díaz M, Ramos-Jiménez J, Sánchez-Guillén MC. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine-antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int J Parasitol.* 33: 293-299, 2003.

Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, Romero-Díaz M, Pulido-Pérez P, Sánchez-Guillén MC. Correlation of the serum concentrations of tumor necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 101: 123-132, 2007

Penninx B, Milaneschi Y, Lamers F, Vogelzangs N. Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile. *BMC Medicine.* 11:129, 2013.

Petkov VD, Belcheva S, Konstantinova E, Kehayov R. Participation of different 5-HT receptors in the memory process in rats and its modulation by the serotonin depletor p-chlorophenylalanine. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 55: 243-52, 1995.

Pinto AMT, Sales PCM, Camargos ERS, Silva AM. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF- κ B activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*. 13: 1518-1529, 2011.

Pires LL. Avaliação de uma vacina contra *Trypanosoma cruzi* em cães. [tese de mestrado] Universidade de Brasília, Brasília. 1978.

Pittella JE, Meneguette C, Barbosa AJ, Bambirra EA. Histopathological and immunohistochemical study of the brain in the acute and chronic phases of experimental trypanosomiasis cruzi in dogs. *Ann Trop Med Parasitol*. 84: 615-621, 1990.

Pittella JE. Central nervous system involvement in Chagas' disease. An updating. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 35, 111-116, 1993.

Pittella JE. Central nervous system involvement in experimental Trypanosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 86: 141-145, 1991.

Pittella JE. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 103: 973-978, 2009.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 229: 327-336, 1977.

Poulin R. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *Int J Parasitol*. 25: 1371-1383, 1995.

Póvoa R, Cavichio L, Almeida AL, Viotti D, Ferreira C, Galvão L, Pimenta J. Alterações Eletrocardiográficas nas Doenças Neurológicas Arq Bras Cardiol. 80: 351-354, 2003.

Putilina MV. Anxiety-depressive disorders and stroke: possible etiopathogenetic correlations. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.114: 86-92, 2014.

Prata A. Chagas' disease. Infec. Dis. Clin. N. Am. 8: 61-76, 1994.

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

Prost JO, Villanueva HR, Morikone AM, Polo G, Bosch AM. Evidencias de compromiso cerebral en el estadio crónico de la enfermedad de chagas obtenidas por medio del potencial p 300 y de electroencefalografía cuantificada. Arq Neuropsiquiatr. 58: 262-271, 2000.

Qiu HM, Yang JX, Jiang XH, Fei HZ, Liu D, Hu XY, Zhou QX. Upregulating serotonin transporter expression and downregulating monoamine oxidase-A and indoleamine 2, 3-dioxygenase expression involved in the antidepressant effect of sodium valproate in a rat model. Neuroreport. 25: 1338-1343, 2014.

Queiroz AC. Encefalomielite chagásica experimental em cães. Rev Pat Trop. 4: 95-101, 1975.

Queiroz AC. Estudo das alterações encefálicas em casos humanos agudos da doença de chagas. Rev Pat Trop. 7: 13-22, 1978.

Quevedo J, Feier G, Agostinho FR, Martins MR, Roesler R. Consolidação da memória e estresse pós-traumático. Rev. Bras. Psiquiatria. 25: 25-30, 2003.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ. Gliogenesis and glial pathology in depression. CNS Neurol Disord Drug Targets. 6: 219-233, 2007.

Rajkowska G, Stockmeier CA. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets*. 14: 1225-1236, 2013.

Rasse Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1: 152-158, 2009.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 26: 275-291, 2012.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 375: 1388-1402, 2010.

Rassi A Jr, Rassi SG, Rassi A. Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. 76: 75-96, 2001.

Ravindran LN, Stein MB. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *J Clin Psychiatry*. 71: 839-54, 2010.

Ravnkilde B, Clemmensen K, Egande A, Rasmussen NA, Rosenberg R. Cognitive deficits in major depression *Scandinavian Journal of Psychology*. 43: 239–251, 2002.

Reed JM; Squire L. R. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behav Neurosci*. 111: 667-75, 1997.

Redlich K, Hayer S, Maier A, Dunstan CR, Tohidast-Akrad M, Lang S, Türk B, Pietschmann P, Woloszczuk W, Haralambous S, Kollias G, Steiner G, Smolen JS, Schett G. Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum*. 46: 785-792, 2002.

Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis

factor-alpha cells and dominance of granzyme A, CD8 lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48: 637– 644, 1993.

Reisberg D & Heuer F. Memory for emotional events. In D. Reisberg & P. Hertel (Eds.), *Memory and emotion* (pp.3-40). Oxford: Oxford University, 2004.

.Reynolds A, Laurie C, Mosley RL, Gendelman HE. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol.* 82: 297- 325, 2007.

Rex A, Sondern U, Voigt JP, Franck S, Fink H. Strain differences in fear-motivated behavior of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 54:107–111, 1996.

Rivieccio MA, John GR, Song X, Suh HS, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF. The cytokine IL-1beta activates IFN response factor 3 in human fetal astrocytes in culture. *J Immunol* 174: 3719-3726, 2005.

Rocha A, de Meneses AC, da Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MK, Almeida E, Turcato Júnior G, Metze K, Lopes ER. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 50: 261-268, 1994.

Rodgers RJ. Animal models of 'anxiety': where next? *Behav Pharmacol.* 8: 477-496, 1997.

Rodnight RB, Gottfried C. Morphological plasticity of rodent astroglia. *Neurochem.* 124: 263-275, 2013.

Roffê E, Silva AA, Marino AP, dos Santos PV, Lannes-Vieira J. Essential role of VLA-4/VCAM-1 pathway in the establishment of CD8⁺ T-cell-mediated *Trypanosoma cruzi*-elicited meningoencephalitis. *J Neuroimmunol.* 142: 17-30, 2003.

.

Rogers Timothy T Peter Garrard Matthew A. Lambon Ralph Structure and Deterioration of Semantic Memory: A Neuropsychological and Computational

Investigation Psychological Review American Psychological Association, Inc. 111: 205–235, 2004.

Rosen JB, Schulkin J From normal fear to pathological anxiety. *Psychol Rev.* 105: 325-50, 1998.

Rosenblat JD, Cha DS, Mansur RB, McIntyre RS. Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 53: 23-34, 2014.

Rossato JI, Bevilacqua LRM.; Myskiw JC.; Medina JH.; Izquierdo IC On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 14: 36-46, 2007.

Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull.* 80: 224-232, 2009.

Rozenfeld C, Martinez R, Figueiredo RT, Bozza MT, Lima FR, Pires AL, Silva PM, Bonomo A, Lannes-Vieira J, De Souza W, Moura-Neto V. Soluble factors released by *Toxoplasma gondii*-infected astrocytes down-modulate nitric oxide production by gamma interferon-activated microglia and prevent neuronal degeneration. *Infect Immun.* 71:2047-2057, 2003.

Rucan PL, Hategan, Barbat C, Alexiu MT. The emergence of depression in the elderly. *Procedia Social and Behavioral Sciences.* 2: 4966-4971, 2010.

Rumsfeld JS, Ho PM. Depression and cardiovascular disease: a call for recognition. *Circulation.* 111: 250–253, 2005.

Sadek HA, Humphries KM, Szweda PA, Szweda LI. Selective inactivation of redox-sensitive mitochondrial enzymes during cardiac reperfusion. *Arch Biochem Biophys.* 406: 222-228, 2002.

±

Salles G, Xavier S, Sousa A, Hasslocher-Moreno A, Cardoso C. Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-up study. *Circulation*.108: 305-12, 2003.

Sanabria A. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse brain. *Exp Parasitol*.3:379-91,1968.

Sanabria A, Aristimuño J. New studies on the histochemistry and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*, in the brain of the mice. *Acta Cient Venez*. 1:32-9, 1969.

Sanches TL, Cunha LD, Silva GK, Guedes PM, Silva JS, Zamboni DS. The use of heterogeneously controlled mouse population reveals a significant correlation of acute phase parasitemia with mortality in Chagas disease. *PLoS One* 9: e91640, 2014.

Santos FM, Lima WG, Gravel AS, Martins TA, Talvani A, Torres RM, Bahia MT. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*. 67: 1987-95, 2012.

Sanz A. Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? *Biochimica et Biophysica Acta*. 4: 3-7, 2016.

Sargsyan SA, Monk PN, Shaw PJ. Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*. 51: 241-253, 2005.

Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation*. 4: 26, 2007.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. I diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arq Brasil Card*. 97, 2011.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*. 122, 509–522, 1965.

Schlachetzki JC, Saliba SW, Oliveira AC. Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Rev Bras Psiquiatr.* 35: 92-100, 2013.

Schrocksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 364: 82–90, 2006.

Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, P. *Anatomia & Fisiologia* 3ª ed. Loures: Lusodidacta, 2011.

Serge AM , Charles M, Neuza L , Barbara I , João Carlos Pinto Dias , Dalmo Correia and Michael E. Farkouh. Chagas disease as a mechanistic model for testing a novel hypothesis *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 41:70-72, 2008.

Steele JD, Lawrie SM . Segregation of cognitive and emotional function in the prefrontal cortex: a stereotactic meta-analysis. *Neuroimage.* 21: 868-75, 2004.

Seth P, Koul N. Astrocyte, the star *avatar*: redefined. *J Biosci.* 33, 405-421, 2008.

Sheps DS, Sheffield D. Depression, anxiety, and the cardiovascular system: the cardiologist's perspective. *J Clin Psychiatry.* 8: 12–16, 2001.

Sibille E.; Lewis DA. Certainly involved in depression, but when? *Am J Psychiatry.* 163: 8-11, 2006.

Silva JS, Machado FS, Martins GA. O papel do óxido nítrico na patogênese da doença de Chagas .*Frente Biosci.* 8 : S314-S325, 2003.

Silva AA, Roffê E, Marino AP, dos Santos PV, Quirico-Santos T, Paiva CN, Lannes-Vieira J. Chagas' disease encephalitis: intense CD8⁺ lymphocytic infiltrate is restricted to the acute phase, but is not related to the presence of *Trypanosom cruzi* antigens. *Clin Immunol.* 92: 56-66, 1999.

Silva AA, Roffê E, Santiago H, marino AP, Kroll-Palhares K, Teixeira MM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi*-triggered meningoencephalitis is a CCR1/CCR5-independent inflammatory process. *J Neuroimmunol.* 184: 156-163, 2007.

Silva AA, Vilar-Pereira G, Souza AS, Silva RR, Rocha MS, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi*-Induced Central Nervous System Alterations: From the Entry of Inflammatory Cells to Potential Cognitive and Psychiatric Abnormalities. *J Neuroparasitology.* 1, 2010.

Silva AA. Meningoencefalite experimental induzida pelo *Trypanosoma cruzi*: mecanismos moleculares de entrada das células inflamatórias para o sistema nervoso central. [tese de doutorado]. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

Silva, RC. & Brandão, ML. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. *Pharmacol Biochem Behav.* 65: 209-216, 2000.

Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 63: 4862-4867, 1995.

Silva RR, Mariante RM, Silva AA, Dos Santos AL, Roffê E, Santiago H, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* 10: e0118600, 2015.

Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli MC, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. CD8⁺ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 8: e1002645, 2012.

Skinner BF. Emoção. In B. F. Skinner. (Ed.), *Ciência e comportamento humano*. São Paulo: Martins Fontes. 175-186, 2003.

Skinner BF. O comportamento operante. In B. F. Skinner. (Ed.), Sobre o behaviorismo. São Paulo: Editora Cultrix . 43-64, 2006.

Sliwa K, Woodiwiss A, Kone VN, Candy G, Badenhorst D, Norton G, et al. Terapia de miocardiopatia isquêmica com a pentoxifilina agente imunomodulador: resultados de um estudo randomizado . *Circulation*. 109:: 750-755, 2004.

Schandene L.; Vandenbussche P; Crusiaux A; Alegre ML. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) by monocyte and T cells. *Immunology*. 76: 30-34, 1992.

.Schmidt HD, Banasr M, Duman RS. Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 5: 151-6, 2008.

Smiłowska M, Szewczyk B, Woźniak M, Wawrzak-Wleciał A, Domin H. Glial degeneration as a model of depression. *Pharmacol Rep*. 65: 1572-1579, 2013.

Simon V, Ho DD, Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*. 368: 489-504, 2006.

Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 417: 39-44, 2002.

Spina-França A, Livramento JA, Machado LR, Yasuda N. *Trypanosoma cruzi* antibodies in the cerebrospinal fluid: a search using complement fixation and immunofluorescence reactions. *Arq Neuropsiquiatr*. 46: 374-378, 1988.

Squire LR & Kandel ER. Memória: da mente às moléculas. Porto Alegre: Artmed. 2003.

Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Hontebeyrie-Joskowicz M. Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res Immunol*. 142: 117-122, 1991.

Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100 β in human brain. *BMC Neurosci.* 8: 2, 2007.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Mico JA, Lenegre A, Steru M, Simon P, Porsolt RD. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 85: 367–370, 1985.

Stober T. Cardiac arrhythmias in subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir.* 93: 37-44, 1998.

Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol.* 103: 1-10, 2014.

Sullivan GW; Carper HT; Novic JR; Mandell GL. Inhibition of the inflammatory action of IL-1 and TNF-alpha of neutrophil function by pentoxifylline. *Infect.Immun.* 56:1722-1729, 1988.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* 51: 524-539, 2009.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. Novos insights sobre o cérebro BDNF função no envelhecimento normal e doença de Alzheimer. *Brain Res Ver.* 59: 201-20, 2008.

Tarassishin L, Suh HS, Lee SC. LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: role of CD14. *Glia.* 62: 999-1013, 2014.

Tariq M, Ahmad MA, Moutaery K, Deeb S. Pentoxifylline ameliorates lithium pilocarpine induced status epilepticus in young rats. *Epilepsy & Behavior.* 12: 354-365, 2008.

Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. Trends Parasitol. 18: 262-265, 2002.

Thomaz CRC. Episódios emocionais como interações entre operantes e respondentes. Porto Alegre: Artmed. 40-48, 2012.

Tinsley MR, Quinn JJ, Fanselow MS. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. Learn Mem. 11: 35-42, 2004.

Torres CM, Villaça J. Encefalite e mielite causadas por um trypanosoma (*T. cruzi*). Mem Inst Oswaldo Cruz. 19: 72-79, 1919.

Tulving E, Markowitsch HJ. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. Hippocampus. 8: 198– 204, 1998.

Tweedie D, Sambamurti K, Greig NH. TNF- α inhibition as a treatment strategy for neurodegenerative disorders: new drug candidates and targets. 4: 378-385, 2007.

Uchoa E, Firmo JO, Dias EC, Pereira MS, Gontijo ED. Signs, meanings, and actions associated with Chagas disease. Cad Saude Publica. 18: 71–79, 2002.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 39: 44–84, 2007.

Van der Feltz-Cornelis CM, Nuyen J, Stoop C, Chan J, Jacobson AM, Katon W, Snoek F, Sartorius N. Effect of interventions for major depressive disorder and significant depressive symptoms in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Gen Hosp Psychiatry. 32: 380-395, 2010.

Van Riezen H, Segal M. Introduction to the evaluation of anxiety and related disorders. New York: Elsevier. 225-228, 1988.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research 0034, 2002.

Vargas-Zambrano JC, Lasso P, Cuellar A, Puerta CJ, González JM. A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108: 212-219, 2013.

Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect Immun*. 62: 5177-5182, 1994.

Vianna MR et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*. 7: 333-340, 2000.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas” (Esquizotripanoze humana ou tireoidite parasitaria). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 3: 276-294, 1911.

Vieira CB. Manifestações psíquicas na forma crônica da moléstia de Chagas, exemplo de hiperatividade orgânica. *Rev Goiana Med*. 10: 127, 1964.

Vilar-Pereira G, Ruiva LA, Lannes-Vieira. Behavioural alterations are independent of sickness behaviour in chronic experimental Chagas disease.. *J. Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110: 1042-1050, 2015

Vilar-Pereira G, Silva AA, Pereira IR, Silva RR, Moreira OC, de Almeida LR, de Souza AS, Rocha MS, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi*-induced depressive like behavior Brain is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. *Brain Behav Immun*. 26: 1136-1149, 2012.

Villalba R, Fornés G, Alvarez MA, Román J, Rubio V, Fernández M, García JM, Viñals M, Torres A. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin Infect Dis.* 14: 594-595, 1992.

Villalta F, Dobish MC, Nde PN, Kleshchenko YY, Hargrove TY, Johnson CA, Waterman MR, Johnston JN, Lepesheva GI. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. *J Infect Dis.* 208: 504-511, 2013.

Villegas SN, Poletta FA, Carri NG. GLIA: A reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. *Cell Biol Int.* 27: 599-609, 2003.

Villela E, Torres C. Magarinos Estudo histo-pathologico do systema nervoso central em paralyisia experimental determinada pelo *Schizotrypanum Cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 19: 175-221, 1926.

Villela E, Villela E. Elementos do sistema nervoso central parasitados pelo *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 26: 77-81, 1932.

Viotti R, Vigliano C. Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 5: 717-26, 2007.

Xu Y, Wang C, Jonathan J. Klabnik and James M. Novel Therapeutic Targets in Depression and Anxiety: Antioxidants as a Candidate Treatment *Current Neuropharmacolog.* 12: 108-119, 2014.

Hyung-Mun Yun, Kyung-Ran Park, Eun-Cheol Kim, Sanghyeon Kim, and Jin Tae Hong Serotonin 6 receptor controls alzheimer's disease and depression *Oncotarget.* 6: 26716–26728, 2015.

Wackermann PV, Fernandes RM, Elias J Jr., dos Santos AC, Marques W Jr., Barreira AA. Involvement of the central nervous system in the chronic form of Chagas' disease. *J Neurol Sci.* 269: 152-157, 2008.

Wang Y.-P., Andrade LH & Gorenstein, C. Validation of the Beck Depression Inventory for a portuguese-speaking chinese community in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38, 399-408, 2005.

Weiland-Fiedler P , Erickson K , Waldeck T , Luckenbaugh DA , Pike D , Bonne O , Charney DS , Neumeister A . Evidence for continuing neuropsychological impairments in depression. *J Affect Disord*. 82: 253-258, 2004.

Welser-Alves JV, Milner R. Microglia are the major source of TNF-alpha and TGF-beta1 in postnatal glial cultures, regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochem Int*. 63: 47-53, 2013.

Willner P, Scheel-Kruger J, Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 37: 331–2371, 2013.

WONG, M.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nature Rev Neurosci*. 2: 343-351, 2001.

World Health Organization. Carta de Ottawa. In: Ministério da Saúde (Br). *Promoção da saúde: Cartas de Ottawa, Adelaide, Sundsvall e Santa Fé de Bogotá*. Brasília (DF): Ministério da Saúde/FIOCRUZ. 1986.

Zeledón R, Rabinovich JE. Chagas' disease: na ecological appraisal with special emphasis on it insect vectors. *Annu Rev Entomol*. 26: 101-133, 1981.

Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry*. 63: 856–864, 2006.

Zeltser LM, Seeley RJ, Tschöp MH . Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. . *Nat Neurosci*. 15: 1336-1342, 2012.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ,

Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104: 1051-1054, 2009.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 12: 240-253, 2012.

ZHANG S., QIU BS, ZHAO,C Functional protection of pentoxifylline against spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: Necrosis apoptosis effects.Chinese Medical Journal. 121: 2444-2449. 2008

Zhu S. Psychosis may be associated with toxoplasmosis. Med Hypot. 73: 799-801, 2009.

12. Anexos