



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NEIDE MARTINS MOREIRA

**Influência do exercício físico moderado pré-infecção sobre
a parasitemia, neurônios mientéricos, patologia e
imunologia de camundongos infectados
experimentalmente por *Trypanosoma cruzi***

Maringá – Paraná

2014

NEIDE MARTINS MOREIRA

Influência do exercício físico moderado pré-infecção sobre a parasitemia, neurônios mientéricos, patologia e imunologia de camundongos infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi*

Artigos apresentados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Marques de Araújo.

Maringá - Paraná

2014

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Campus de Foz do Iguaçu – Unioeste
Ficha catalográfica elaborada por Miriam Fenner R. Lucas - CRB-9/268

M838 Moreira, Neide Martins

Influência do exercício físico moderado pré-infecção sobre a parasitemia, neurônios mientéricos, patologia e imunologia de camundongos infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi* / Neide Martins Moreira. – Maringá, 2014.

149 f. : tab. : graf.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Marques de Araújo.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Maringá.

1. Exercício físico. 2. *Trypanosoma cruzi* – Doença de Chagas – Parasitologia. 3. Cólon. 4. Plexo mientérico. 5. TNF- α . 6. TGF- β . I. Título.

CDU 613.72
616.937: 576.8

FOLHA DE APROVAÇÃO

NEIDE MARTINS MOREIRA

Influência do exercício físico moderado pré-infecção sobre a parasitemia, neurônios mientéricos, patologia e imunologia de camundongos infectados experimentalmente por *Trypanosoma cruzi*

Artigos apresentados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros da banca:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Débora de Mello Gonçalves Sant’Ana
Universidade Estadual de Maringá (Membro Convidado)

Prof^ª. Dr^ª. Laura Beatriz Mesiano Maifrino
Universidade São Judas Tadeu (Membro Convidado)

Prof^ª. Dr^ª. Solange Marta Franzói de Moraes
Universidade Estadual de Maringá (Membro Convidado)

Prof^ª. Dr^ª. Áurea Regina Telles Pupulin
Universidade Estadual de Maringá (Membro Convidado)

Prof^ª. Dr^ª. Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá (Presidente da Banca – Orientadora)

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

DEDICATÓRIA

A **“Deus”**, a quem posso contar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, **Joaquim e Marinei**, os quais me ensinaram tudo que um ser humano necessita aprender para se tornar honesto.

Aos meus irmãos, **Jair e Norma**, pelo constante apoio e amizade.

Aos meus sobrinhos, **Tiago, Juliana e Guilherme** pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu concluísse mais essa etapa da minha vida e pelos momentos de dificuldade que me moldam a cada instante para ser um ser humano mais digno.

À minha família, que me apoiou em todos os momentos, mas principalmente naqueles de angústia e desânimo.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Silvana Marques de Araújo. Tentei encontrar palavras para descrever tudo o que vivenciamos juntas durante esta longa jornada de Mestrado e Doutorado, mas não as encontrei. Assim sendo, consigo dizer-lhe apenas uma coisa, Muito obrigada!

À Universidade Estadual de Maringá - UEM, que através de seu Programa de Pós-Gradual em Ciências da Saúde, permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

À Secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Olívia, pela sua dedicação e paciência.

Aos Professores do Setor de Parasitologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, por ajudarem-me sempre que necessário.

Aos funcionários, Maria Betânia, Sandra, Elza, Silvana Silva, Isabel, João e Maristela, Dona Neusa e Tereza, pelo apoio e por favorecerem a existência de um ambiente agradável.

A todos os alunos de Iniciação Científica e de Pós-Graduação do Laboratório de Parasitologia Básica.

Aos membros da banca de defesa: Prof^ª. Dr^ª. Débora de Mello G. Sant'Ana, Prof^ª. Dr^ª. Solange Marta F. de Moraes, Prof^ª. Dr^ª. Laura Beatriz M. Maifrino, Prof^ª. Dr^ª. Áurea Regina T. Pupulin e Prof^ª. Dr^ª. Silvana M. de Araújo; (pág. iv) por terem aceitado a participar da avaliação deste trabalho.

Aos camundongos, pois sem eles este trabalho não existiria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos vocês, muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Alguns homens vêem as coisas
como são, e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca
foram e digo ‘Por que não?’”

(GEROGE BERNARD SHAW)

RESUMO

Introdução: O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, ao invadir o hospedeiro atinge uma ampla variedade de tecidos, incluindo coração, intestinos/esôfago e sistema nervoso central. O megaesôfago e o megacolo são descritos como as principais lesões do trato gastrointestinal, e os distúrbios de motilidade estão associados à constipação e dilatação de vísceras, acompanhados ou não de espessamento da parede intestinal, processos decorrentes da destruição de neurônios do Sistema Nervoso Entérico – SNE. A prática do exercício físico moderado tem contribuído de forma significativa para a manutenção do número de neurônios mientéricos. Da mesma forma, o exercício físico moderado representa um fator de resistência ao desenvolvimento de infecções causadas por protozoários em animais, atuando como estimulador da resposta imunológica. No entanto, não estão disponíveis relatos de alterações produzidas no plexo mientérico e na parede do cólon de camundongos submetidos ao exercício físico moderado e infectados por *T. cruzi*. Sendo assim, este trabalho verificou a influência do exercício físico moderado sobre neurônios da população neuronal mientérica total, neurônios metabolicamente mais ativos, neurônios nitrérgicos e da parede do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi* relacionadas a aspectos parasitológicos e imunológicos da infecção. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 120 camundongos suíços machos com 30 dias de vida distribuídos em quatro grupos: Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Os grupos TC e TI foram submetidos a programa de exercício físico moderado em esteira rolante, durante oito semanas. Três dias após o término do exercício físico os grupos TI e SI foram inoculados com 1300 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. A indução da fase crônica foi obtida administrando-se cinco doses de LAFEPE BENZNIDAZOL, três doses (100 mg/Kg/m.c. aos 11, 15 e 22 dias após a inoculação, dpi) e duas doses (250 mg/Kg/m.c. aos 18 e 41 dpi), respectivamente. A parasitemia foi avaliada do 4º. - 61º. dias após inoculação. Após 75 dias de infecção foram quantificados/medidos neurônios da população neuronal mientérica total (Giemsa), neurônios metabolicamente mais ativos (NADH-diaforase) e imunorreativos a nNOS (Imunofluorescência) (5 animais/grupo/técnica). Foi ainda mensurada a espessura da parede intestinal, para evidenciar histoquímica de linfócitos intra-epiteliais (LIE), focos inflamatórios (Hematoxilina-Eosina) células calciformes positivas a (Periodic Acid Schiff (PAS) e ao Alcian Blue (AB) pH 1,0+ e 2,5+ - 10 animais/grupo), dosados fator de necrose tumoral-alfa

(TNF- α) e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) no plasma (ELISA - 10 animais/grupo). Os resultados foram comparados com os testes ANOVA seguido pelo teste Tukey e Kruskal-Wallis, com significância de 5%. **Resultados:** O exercício físico moderado reduziu o pico de parasitos no 8º dia de infecção (TI: $4,0 \times 10^6$ e SI: $9,8 \times 10^6$ tripomastigotas/mL) ($P=0,0132$) e a parasitemia total (TI: $9,4 \times 10^6$ e SI: $16,9 \times 10^6$ tripomastigotas/mL) ($p=0,0307$). Contribuiu para a sobrevivência do número de neurônios da população neuronal mientérica total em 8,0% (TI x SI - $p<0,05$), neurônios NADH-d em 26,0% (TI x SI - $p<0,01$) e neurônios imunorreativos a nNOS em 16,8% no grupo (TI x SI - $p<0,05$). A infecção por *T. cruzi* causou redução do número de neurônios da população neuronal mientérica total em 39% (SI x SC - $p<0,05$), neurônios NADH-d em 38,7% (SI x SC - $p<0,01$) e neurônios imunorreativos a nNOS em 47,7 (SI x SC - $p<0,05$). O exercício físico provocou hipertrofia de neurônios mientéricos com aumento da área nuclear e citoplasmática o que resultou no aumento da área do corpo neuronal da população neuronal mientérica total ($p<0,05$), de neurônios NADH-d ($p<0,05$), de neurônios nitrérgicos ($p>0,05$) e no aumento da espessura total da parede intestinal em 7,3% (TI x SI - $p<0,05$). Nos animais sedentários a infecção por *T. cruzi* provocou redução da espessura total da parede intestinal em 6,7% (SI x SC - $p<0,05$). O exercício físico promoveu aumento de 5,7% do número de LIE (TI x SI - $p<0,05$) em relação ao número de enterócitos. Nos animais sedentários a infecção promoveu redução de 39,0% (SI x SC - ($p>0,05$)) da proporção de LIE. Nos animais treinados, a proporção de células caliciformes produtoras de mucinas neutras (PAS+) e ácidas (AB pH 2,5+) e (AB pH 1,0+) estava reduzida em 2,0%, 15,0% e 18,0% relação aos animais sedentários ($p<0,05$). O exercício físico moderado impediu a formação de focos inflamatórios na túnica muscular intestinal em 72,2% para TI x SI ($p<0,01$). O TNF- α e TGF- β estavam aumentados em 18,0% ($p<0,05$) e 18,0% ($p>0,05$) respectivamente, considerando TI x SI. **Conclusão:** O exercício físico moderado altera a evolução da infecção diminuindo parasitemia na fase aguda da infecção experimental de camundongos com *T. cruzi*, protege os neurônios mientéricos e induz a hipertrofia de neurônios, significando melhor prognóstico para o animal cronicamente infectado com relação à manutenção do peristaltismo intestinal. Além disso, provoca aumento da espessura total da parede intestinal, aumento do número de linfócitos intra-epiteliais/enterócitos, redução da proporção de células caliciformes/enterócitos e do número de focos inflamatórios e aumento da síntese de TNF- α e TGF- β . Estes resultados aprofundam a fundamentação já consistente e sólida dos benefícios que o exercício físico representa para a população de maneira geral e agora, especificamente para indivíduos

parasitados por *T. cruzi*. Levam a perspectivas reais de melhoria de atendimento a estes indivíduos no contexto individual e de saúde pública, fortalecendo a necessidade de implantação de atividade física como opção de tratamento complementar direcionado a esses indivíduos.

Palavras-chave: Exercício físico moderado, *Trypanosoma cruzi*, cólon, plexo mientérico, TNF- α , TGF- β .

ABSTRACT

Introduction: *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease by invading the host reaches a wide variety of tissues, including heart, intestine/esophagus and central nervous system. Megaesophagus and megacolon are described as the main lesions of the gastrointestinal tract, and motility disorders are associated with constipation and swelling of viscera, with or without thickening of the intestinal wall, proceedings relating to the destruction of neurons in the enteric nervous system - SNE. The practice of moderate physical exercise has contributed significantly to the maintenance of the number of myenteric neurons. Likewise, moderate physical exercise is a factor of resistance to the development of protozoal infections in animals, acting as a stimulator of immune response. However, reports of changes produced in the myenteric plexus and the wall of the colon of mice subjected to moderate exercise and infected by *T. cruzi* not disposable. Thus, this study examined the influence of moderate physical exercise on neurons of the total myenteric neuronal population, more metabolically active neurons, nitrergic neurons and the wall of the colon of mice infected with *T. cruzi* related aspects parasitologic and immunologic of infection. **Materials and methods:** A total of 120 male Swiss mice at 30 days of age divided into four groups: Trained Control (TC), Trained Infected (TI), Sedentary Control (SC) and Sedentary Infected (SI). TC and TI groups underwent moderate exercise program on a treadmill for eight weeks. Three days after the exercise groups TI and SI were inoculated with 1300 blood trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi*. The induction of chronic phase was achieved by administration of five doses of benznidazole LAFEPE three doses (100 mg/Kg/b.m to 11, 15 and 22 days after inoculation, dpi) and two doses (250 mg/Kg/b.m at 18 and 41 dpi), respectively. The parasitemia was evaluated in the day 4 to day 61 after inoculation. After 75 days of infection were quantified/measured neurons of total myenteric neuronal population (Giemsa), more metabolically active neurons, (NADH-diaphorase) and immunoreactive neurons nNOS (immunofluorescence) (5 animals/group/technical). It was further measured the thickness of the intestinal wall, to show staining of intraepithelial lymphocytes (IEL) inflammatory foci (hematoxylin-eosin) positive goblet cells (Periodic Acid Schiff (PAS) and Alcian blue (AB) pH 1.0+ and 2.5+-10 animals/group), measured tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and transforming growth factor-b (TGF- β) in plasma (ELISA - 10 animals/group). The results were compared with ANOVA followed by Tukey test and Kruskal-Wallis test with a significance level of 5%. **Results:** Moderate physical exercise reduced the peak of parasites

on day 8 of infection (TI: 4.0×10^6 and SI: 9.8×10^6 trypomastigotes /mL) ($p = 0.0132$) and total parasitemia (TI: 9.4×10^6 and IS: 16.9×10^6 trypomastigote/mL) ($p = 0.0307$). Contributed to the survival of the number of neurons in the total myenteric neuronal population 8.0% (TI x SI - $p < 0.05$), NADH-d neurons in 26.0% (TI x SI - $p < 0.01$) and immunoreactive neurons nNOS 16.8% in the group (TI x SI - $p < 0.05$). Infection by *T. cruzi* caused a reduction in the number of neurons in the total myenteric neuronal population 39% (SI x SC - $p < 0.05$), NADH-d in 38.7% (SI x SC - $p < 0.01$) and immunoreactive neurons nNOS in 47.7 (SI x SC - $p < 0.05$). The exercise physical caused hypertrophy of myenteric neurons with increased nuclear area and cytoplasmic which resulted in increasing the area of the body neuronal in the total myenteric neuronal population ($p < 0.05$), NADH-d ($p < 0.05$), nitrergic neurons ($p > 0.05$) and an increase in total thickness of the intestinal wall 7.3% (TI x SI - $p < 0.05$). In sedentary animals to infection by *T. cruzi* caused a reduction of the total thickness of the intestinal wall in 6.7% (SI x SC - $p < 0.05$). The physical exercise promoted an increase of 5.7% of the IELs (TI x SI - $p < 0.05$) compared to the number of enterocytes. In sedentary animals the infection caused a reduction of 39.0% (SI x SC - ($p > 0.05$)) of proportion of IELs. In the trained animals, the proportion of goblet cells mucin-producing neutral (PAS+) and acidic (pH 2.5 + AB) and (AB + pH 1.0) was reduced by 2.0%, 15.0% and 18.0% compared to the sedentary animals ($p < 0.05$). Moderate physical exercise prevented the formation of inflammatory foci in the muscular bowel in 72.2% for TI x SI ($p < 0.01$). TNF- α and TGF- β were increased by 18.0% ($p < 0.05$) and 18.0% ($p > 0.05$) respectively, whereas TI x SI. **Conclusion:** Moderate physical exercise alters the course of infection decreasing parasitemia in the acute phase of experimental infection of mice with *T. cruzi* protects myenteric neurons and induces hypertrophy of neurons, meaning better prognosis for the animal chronically infected with respect to the maintenance of intestinal peristalsis. Furthermore, it causes increase of the total thickness of the intestinal wall increased number of lymphocytes intra-epiteliais/enterócitos, reducing the proportion of goblet cells/enterocytes and the number of inflammatory foci and increased synthesis of TNF- α and TGF- β . These results deepen the already consistent and solid foundation of the benefits that physical exercise is for the population in general and now, specifically for individuals parasitized by *T. cruzi*. Lead to real prospects for improvement for these individuals in the context of individual and public health, strengthening the need for deployment of moderate physical activity as a treatment option complementary directed to these individuals.

Keywords: Moderate physical exercise, *Trypanosoma cruzi*, colon, myenteric plexus, TNF- α , TGF- β .

Tese elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II):

Artigos científicos encaminhados e/ou publicados nos periódicos:

Artigo 1: Exercício físico moderado reduz parasitemia e protege neurônios mientéricos do cólon de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Periódico: *International Journal of Experimental Pathology*. Disponível em: <http://mc.manuscriptcentral.com/ijep>.

Artigo 2: Exercício físico moderado protege neurônios mientéricos metabolicamente mais ativos em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Periódico: *Digestive Diseases and Sciences*. Disponível em: <http://www.editorialmanager.com/ddsj/>.

Artigo 3: Exercício físico moderado protege os neurônios mientéricos e reduz a parasitemia na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Periódico: *Experimental Parasitology*. Disponível em: <http://www.elsevier.com/journals/experimental-parasitology/0014-4894/guide-for-authors>.

SUMÁRIO (Algarismo Árabe)

| | | |
|-------|--|-----|
| 1 | CAPÍTULO I..... | 17 |
| 1.1 | Agente etiológico da doença de Chagas e a epidemiologia..... | 17 |
| 1.2 | Ciclo de vida do parasito e suas formas evolutivas..... | 17 |
| 1.3 | Patologia da doença..... | 18 |
| 1.4 | Tratamento farmacológico..... | 19 |
| 1.5 | Tratamento alternativo..... | 20 |
| 1.6 | Objetivos..... | 21 |
| 1.7 | Referências..... | 22 |
| 2 | CAPÍTULO II..... | 26 |
| 2.1 | Artigo 1: Exercício físico moderado reduz parasitemia e protege neurônios mientéricos do cólon de camundongos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> | 26 |
| 2.1.1 | Apêndice..... | 54 |
| 2.1.2 | Anexos..... | 56 |
| 2.2 | Artigo 2: Exercício físico moderado preserva neurônios mientéricos, diminui parasitemia e inflamação em camundongos com <i>Trypanosoma cruzi</i> | 68 |
| 2.2.1 | Anexos..... | 92 |
| 2.3 | Artigo 3: Exercício físico protege os neurônios mientéricos e reduz a parasitemia na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> | 103 |
| 2.3.1 | Anexos..... | 126 |
| 3 | CAPÍTULO III..... | 148 |
| 3.1 | Conclusões..... | 148 |
| 3.2 | Perspectivas futuras..... | 149 |

CAPÍTULO I

AGENTE ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS E A EPIDEMIOLOGIA

A doença de Chagas é resultante da infecção causada por um protozoário flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*. É limitada primariamente ao continente americano em decorrência da distribuição do vetor estar restrito a este continente. Entretanto, são registrados casos em países não endêmicos por outros mecanismos de transmissão (PORTAL DA SAÚDE, 2012). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por este parasito, principalmente na América Latina e mais de 25 milhões estejam expostas ao risco de contrair a infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). No Brasil, atualmente predominam os casos crônicos de doença de Chagas, com aproximadamente três milhões de pessoas infectadas (PORTAL DA SAÚDE, 2012). Contudo, nos últimos anos, a ocorrência da doença na fase aguda tem sido observada nos estados da Amazônia Legal, com ocorrência de casos isolados em outros estados, devido à ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros) e casos isolados por transmissão vetorial extradomiciliar (PORTAL DA SAÚDE, 2012). No período de 2000 a 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda. Destes, 70% (877/1.252) foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial (92/1.252), e em 22% (276/1.252) não foi identificada a forma de transmissão (PORTAL DA SAÚDE, 2012).

CICLO DE VIDA DO PARASITO E SUAS FORMAS EVOLUTIVAS

O *T. cruzi* possui em seu ciclo de vida, nos hospedeiros vertebrados e invertebrados várias formas evolutivas. Nos vertebrados são encontradas intracelularmente as formas amastígotas em proliferação e, extracelularmente as tripomastígotas presentes no sangue circulante, sendo ambas as formas infectantes para os vertebrados. Nos invertebrados, são observadas extracelularmente formas denominadas esferomastígotas presentes no estômago e intestino do triatomíneo que após se diferenciarem em epimastígotas se proliferam no intestino do inseto. Na sequência, através de um processo denominado metaciclogênese as formas epimastígotas se transformam em tripomastígotas metacíclicas presentes no reto. A

forma metacíclica constitui a forma mais natural de infecção para o hospedeiro vertebrado (REY, 2008; LOURENCO, 2008).

PATOLOGIA DA DOENÇA

Após a infecção os pacientes desenvolvem a fase aguda da doença apresentando predominância do parasito na corrente sanguínea, em níveis elevados. Além disso, vários tecidos são invadidos, dentre eles, o muscular e o nervoso (REY, 2008). No que se refere às manifestações clínicas, é possível observar presença de febre, cefaléia, fraqueza intensa, hepatoesplenomegalia e insuficiência cardíaca (REY, 2008).

Superada a fase aguda, 60% a 70% dos indivíduos infectados, evoluem para a forma indeterminada crônica, sem nenhuma manifestação clínica da doença. Entre 30% a 40 dos infectados desenvolve formas clínicas crônicas, relacionadas às complicações, cardíaca, digestiva e/ou mista (cardiodigestiva) (CHAGAS, 2012).

A forma crônica cardíaca sintomática é caracterizada por insuficiência cardíaca, resultante da diminuição da massa muscular que se apresenta muito destruída devido à substituição por áreas de fibrose interrompendo fibras e fascículos. Além disso, observa-se destruição de neurônios parassimpáticos, ocorrida, sobretudo na fase aguda da doença, trazendo como consequência uma ampla variedade de perturbações, tanto da formação dos estímulos cardíacos, como de sua propagação (REY, 2008). Conseqüentemente ocorre o surgimento da cardiomegalia resultante da incapacidade de adaptação do coração às condições surgidas pela desnervação parassimpática, sendo denominada, cardiomegalia neurogênica (RASSI et al., 2000; REY, 2008; DE LANA e TAFURI, 2011).

A forma digestiva é caracterizada pela formação de megas, megaesôfago e megacólo, sendo descritos como as principais lesões encontradas na doença de Chagas (REY, 2008). As lesões encontradas no tubo digestório são subagudas e crônicas, acompanhadas da destruição de neurônios do Sistema Nervoso Entérico - SNE (REY, 2008; DE LANA, TAFURI apud NEVES et al., 2011; MOREIRA et al., 2011).

Do ponto de vista funcional, os neurônios do SNE podem ser classificados como neurônios motores, interneurônios e neurônios sensoriais (BREHMER, 2006; FURNES e COSTA 2006). Os neurônios motores podem ser divididos em dois grupos, excitatórios e inibitórios, ambos inervam as túnicas musculares e a muscular da mucosa em todo o tubo digestório. Os principais neuromediadores encontrados nos neurônios excitatórios são a

acetilcolina e a substância P. Os neurônios inibitórios possuem vários neuromediadores, como NO (óxido nítrico), VIP e adenosina trifosfato (ATP) (FURNESS, 2000).

Os interneurônios estão localizados em todas as camadas do tubo digestório e sua constituição neuroquímica varia muito, dependendo do órgão em discussão (FURNES e COSTA 2006).

Os neurônios sensoriais traduzem informações sobre o ambiente químico e estado físico do tecido que eles inervam e transmitem essa informação para os interneurônios, os quais projetam a informação para os neurônios motores (FURNESS, 2000; BREHMER, 2006; FURNES e COSTA 2006). Essa comunicação neuronal integrada modifica o estado funcional do órgão.

Na doença de Chagas, como resultado da destruição de neurônios mientéricos, observa-se distúrbio do peristaltismo, falta de coordenação motora, hipertrofia muscular e finalmente, dilatação, levando ao aparecimento do megacolon chagásico (SANTOS JÚNIOR, 2002; Da SILVEIRA et al., 2007; JABARI et al., 2011; PALLISERA et al., 2011), indicando a necessidade de se investigar a população neuronal total mientérica, neurônios metabólicamente mais ativos e neurônios nitrérgicos do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi*.

TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O tratamento etiológico para a doença de Chagas baseia-se em dois fármacos, o benzonidazol e/ou nifurtimox, que quando administrados durante a fase aguda da infecção, podem curar até 70% dos pacientes. No entanto, ambos os medicamentos têm eficácia limitada na fase crônica (FABBRO et al., 2007; HASSLOCHER-MORENO et al., 2012). Dessa forma, pacientes que foram submetidos ao tratamento etiológico podem apresentar sintomas de constipação e complicações intestinais graves (SANTOS JÚNIOR, 2002), consistindo a procura de medidas alternativas visando à melhoria da qualidade de vida desses pacientes um grande desafio.

Indivíduos portadores da doença de Chagas com estas alterações encontram-se perdidos no sistema de saúde brasileiro, pois o SUS (Sistema Único de Saúde) não oferece um caminho de atendimento direcionado a estes indivíduos (JUBERT, 2009). Em 2006, o Ministério da Saúde brasileiro implantou o Núcleo de Apoio à Saúde da Família (NASF), composto por profissionais das mais variadas áreas da saúde, dentre eles o nutricionista, o

educador físico, o fisioterapeuta, o psicólogo e o enfermeiro. Este núcleo tem o objetivo de apoiar as equipes mínimas do Programa de Saúde da Família (PSF), garantindo fatores especiais determinantes e condicionantes de bem-estar físico, mental e social (PORTARIA Nº 971, 2006). Esta iniciativa pode contribuir para a melhoria do atendimento de indivíduos infectados por *T. cruzi*.

O Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá tem como meta a melhoria do atendimento ao paciente infectado por *T. cruzi* (ARAÚJO et al., 2000). Investe em estudos de pesquisa básica e aplicada com este objetivo (SCHEBELESKI-SOARES et al., 2009; MOREIRA et al., 2011; OCCHI et al., 2012).

TRATAMENTO ALTERNATIVO

A literatura mostra que a prática do exercício físico moderado representa um fator de resistência ao desenvolvimento de infecções causadas por protozoários em animais (MALM, 2006), atuando como estimulador da resposta imunológica (NAKAMURA et al., 2010), e modulador positivo nas alterações neuroimunoendócrina em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (ROSA, JÚNIOR, 2005). Pesquisas realizadas com animais mostram os resultados da prática de exercício físico sob a infecção experimental com *T. cruzi* (SCHEBELESKI-SOARES et al., 2009; OCCHI et al., 2012).

Especificamente, o exercício físico moderado tem contribuído de forma significativa para a manutenção do número de neurônios mientéricos comparando-se camundongos saudáveis sedentários e treinados (SILVA, 2006). No entanto, embora existam trabalhos sobre a quantificação e morfometria de neurônios do plexo mientérico de diferentes animais (ODORIZZI et al., 2010; PEREIRA, et al., 2010), relato envolvendo alterações produzidas sobre neurônios do plexo mientérico e na parede do cólon de camundongos submetidos ao exercício físico moderado e infectados por *T. cruzi* não estão disponíveis.

OBJETIVOS

GERAL

- ❖ Verificar a influência do exercício físico moderado sobre neurônios mientéricos e da parede do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi* relacionadas a aspectos parasitológicos, histopatológicos e imunológicos da infecção.

ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do exercício físico moderado sobre:
 - Parâmetros parasitológicos
 - Infectividade, períodos pré-patente e patente, pico de parasitos e parasitemia total;
 - Parâmetros clínicos
 - Mortalidade;
 - Massa corporal;
 - Parâmetros histológicos
 - Morfometria da parede do cólon;
 - Número e morfometria de neurônios mientéricos totais;
 - Número e morfometria de neurônios metabolicamente mais ativos e imunorreativos a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS);
 - Número de células caliciformes do cólon;
 - Parâmetros imunológicos
 - Número de linfócitos intra-epiteliais do cólon;
 - Número de focos inflamatórios da túnica muscular do cólon;
 - Síntese de citocinas interleucina:10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento transformador- β (TGF- β).

REFERÊNCIAS

ARAUJO, S. M.; ANDO, M. H.; CASSAROTT, I. D. J, et al. Programa ACHEI: Atenção ao Chagásico com Educação Integral no município de Maringá e região noroeste do Paraná, Brasil. **Rev Soc Brás Med Trop.** 33: 565-572, 2000.

BREHMER A. **Structure of enteric neurons.** New york: Springer, 2006.

CHAGAS. DESCRIÇÃO DA DOENÇA. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31114.

Acessado em: 05-09-2012.

DA SILVEIRA, A. B.; D'AVILA REIS, D.; DE OLIVEIRA, E. C, et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Dig Dis Sci.** 10: 2877-2883, 2007.

DE LANA, M.; TAFURI W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas In: NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana.** 12^a. ed. São Paulo: Atheneu. 2011. 90-92 p.

FABBRO, D. L.; STREIGER, M. L.; ARIAS, E. D, et al. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fé City (Argentina), over a mean follow-up of 21 yers: parasitological, serological and clinical evolution. **Rev Soc Bras Méd Trop.** 40: 1-10, 2007.

FURNESS, J. *Types of nervous system.* J Auton Nerv Syst: 2000; 87-96 p.

FURNESS, J. B, COSTA, M. **The enteric nervous system.** New York: Churchill livinestone, 2006.

HASSLOCHER-MORENO, A. M, DO BRASIL, P. E, DE SOUSA, A. S, et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **J Antimicrob Chemother**, 5: 1261-1266, 2012.

JABARI, S.; DA SILVEIRA, A. B.; DE OLIVEIRA, E. C, et al. Partial, selective survival of nitrergic neurons in chagasic megacolon. **Histochem Cell Biol**. 1: 47-57, 2011.

JUBERT, C. Chagas: one hundred years later. **Bull World Health Organ**. 87: 491–492, 2009.

LOURENCO, D. C. **Metaciclologênese de *Trypanosoma cruzi*: influência do acúmulo de traçadores endocíticos nos nervossomos e modulação da cruzipaina**. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. **Scand J Med Sci Sports**. 16: 4-6, 2006.

MOREIRA, N. M.; SANT`ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A, et al. Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: an experimental model. **An. Acad. Bras. Ciênc**. 83: 545-55, 2011.

NAKAMURA, S.; KOBAYASHI, M.; SUGINO, T.; et al. Effect of exercise on gene expression profile in unfractionated peripheral blood leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 1: 846-851, 2010.

OCCHI, R. C.; SOARES, C. S.; FRANZÓI-DE-MORAES, S. M, et al. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. **Rev Bras Med Esp**. 18: 51-57, 2012.

ODORIZZI, L.; MOREIRA, N. M, GONÇALVES, G. F, et al. Quantitative and morphometric changes of subpopulations of myenteric neurons in swines with toxoplasmosis. **Auton Neurosci**. 10: 01-12, 2010.

PALLISERA, A.; ORTIZ-DE-ZÁRATE, L.; MORAL, A, et al. Chagas disease in the differential diagnosis of megacolon. **Rev Esp Enferm Dig.** 10: 554-555, 2011.

PEREIRA, L. S.; DA SILVA, A. V.; ARAÚJO, E. J. A, et al. Hypertrophy of NADH-diaphorase positive myenteric neurons in rat jejunum after acute infection caused by *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases.** 16: 298-310, 2010.

PORTAL DA SAÚDE. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454.

Acessado em: 02-10-2012.

Portaria Nº 971, de 3 de Maio de 2006. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde – PNPIC 2006.**

RASSI, A; RASSI, A; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol.** 23: 883-889, 2000.

REY, L. **Parasitologia.** 4^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. 21-23 cap. 205-343 p.

ROSA, L. F. B. P. C.; JÚNIOR, M. L. B. Efeito do treinamento físico modulador positivo nas alterações no eixo neuroimunoendócrino em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica: possível atuação do fator de necrose tumoral- α . **Rev Brás Med Esp.** 11: 238-242, 2005.

SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Megacólon-Parte II: Doença de Chagas. **Ver Brás Coloproctol,** 4: 266-267, 2002.

SCHEBELESKI-SOARES, C.; OCCHI, R. C.; DE MORAES, F, et al. Pre-infection aerobic treadmill training improves resistance against. **Appl Physiol Nut Metab.** 34: 659-665, 2009.

SILVA, E. A. **Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mientérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e**

ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses, 2006. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

World Health Organization. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 02-10-2012.

CAPÍTULO II

**Artigo 1: Exercício físico moderado reduz parasitemia e protege neurônios
mientéricos do cólon de camundongos infectados por *Trypanosoma
cruzi***

Resumo

Foi avaliada a influência do exercício físico moderado sobre neurônios mientéricos e da parede intestinal do cólon de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* considerando aspectos parasitológicos e imunológicos da infecção. Foram utilizados 40 camundongos suíços machos, 30 dias de idade, distribuídos em quatro grupos: Treinado Infectado (TI); Sedentário Infectado (SI); Treinado Controle (TC) e Sedentário Controle (SC). Os grupos TC e TI foram submetidos a programa de exercício físico moderado em esteira rolante, durante oito semanas. Três dias após o término do exercício físico os grupos TI e SI foram inoculados com 1300 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*. A indução da fase crônica foi obtida administrando-se cinco doses de LAFEPE BENZNIDAZOL, três doses (100mg/Kg/m.c. aos 11, 15 e 22 dia após a inoculação, dpi) e duas doses (250mg/Kg/m.c. aos 18 e 41 dpi), respectivamente. A parasitemia foi avaliada do 4º - 61º. dpi. Após 75 dias de infecção foram quantificados/medidos neurônios mientéricos do cólon (coloração de Giemsa - 5 animais/grupo), mensurada a espessura da parede intestinal, contados linfócitos intra-epiteliais (LIE), focos inflamatórios (Hematoxilina-Eosina), células caliciformes (Periodic Acid Schiff (PAS+) e Alcian Blue (AB) pH 1,0+ e 2,5+ (10 animais/grupo), dosados TNF- α e TGF- β no plasma (ELISA - 10 animais/grupo). Os resultados foram comparados com os testes ANOVA-Tukey, Kruskal-Wallis, com significância de 5%. O exercício físico reduziu o pico de parasitos no 8º dia de infecção ($P < 0,05$) e a parasitemia total ($p < 0,05$). Contribuiu para a sobrevivência do número de neurônios ($p < 0,05$). Provocou hipertrofia de neurônios ($p < 0,05$), aumento da espessura total da parede intestinal ($p < 0,05$). No grupo TI a infecção promoveu aumento do número de LIE ($p > 0,05$). Nos animais treinados, o número de células caliciformes produtoras de mucinas neutras (PAS+) e ácidas (AB pH 2,5+) e (AB pH 1,0+) estava reduzida em relação aos animais sedentários ($p < 0,05$). O exercício físico preveniu a formação de focos inflamatórios em animais TI ($p < 0,05$), proporcionou aumento da síntese de TNF- α ($p < 0,05$) e TGF- β ($p > 0,05$). Os resultados mostram em nível celular os benefícios do exercício físico, reafirmando a possibilidade de melhoria de atendimento ao indivíduo chagásico associando esta prática à sua abordagem terapêutica convencional.

Palavras-chave: Treinamento físico, *Trypanosoma cruzi*, cólon, plexo mientérico, TNF- α , TGF- β .

Introdução

A doença de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* constitui um grave problema de saúde pública nos países onde é prevalente (Schmunis e Yadon 2010). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por este parasito, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica sendo que mais de 25 milhões estão expostas ao risco de infecção (World Health Organization 2013). No Brasil aproximadamente três milhões de pessoas estão infectadas atualmente (Portal da Saúde 2013). Durante o curso da doença, o parasito invade uma ampla variedade de órgãos, incluindo coração, sistema nervoso central e intestino/esôfago (Lana e Tafure 2011). O megaesôfago e o megacolo são descritos como as principais manifestações, consequências de lesões do trato gastrointestinal (Pallisera et al. 2011), e os distúrbios de motilidade estão associados à constipação e dilatação de vísceras, acompanhados ou não de espessamento da parede intestinal (Silveira et al. 2007), processos decorrentes da morte de neurônios do Sistema Nervoso Entérico – SNE (Silveira et al. 2007; Lana e Tafure 2011; Pallisera et al. 2011).

O tratamento etiológico para a doença de Chagas baseia-se em dois fármacos, o benzonidazol e/ou nifurtimox, que têm eficácia limitada na fase crônica (Fabbro et al. 2007; Hasslocher-Moreno et al. 2012), condição na qual a maioria dos infectados se encontra. Dessa forma, pacientes que foram submetidos ao tratamento etiológico podem apresentar sintomas de constipação e complicações intestinais graves (Santos Júnior 2002). A busca de medidas alternativas de intervenções visando à melhoria de abordagem desses pacientes consiste um grande desafio.

O Laboratório de Doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá tem como meta a melhoria do atendimento ao paciente infectado por *T. cruzi* (Araújo et al. 2000). Investe em estudos de pesquisa básica e aplicada com este objetivo (Schebeleski-Soares et al. 2009). Dados recentes mostram que a prática do exercício físico moderado (esteira rolante) tem contribuído de forma significativa para a manutenção do número de neurônios mientéricos (Brito Mari et al. 2008; Gagliardo et al. 2008). Da mesma forma, o exercício físico moderado (esteira rolante) representa um fator de resistência ao desenvolvimento de infecções causadas por protozoários em animais (Soares et al. 2010; Occhi et al. 2012), atuando como estimulador da resposta imunológica (Nakamura et al. 2010; Soares et al. 2010) e modulador positivo nas alterações neuroimunoendócrina em pacientes com insuficiência

cardíaca crônica (Rosa e Júnior 2005). Pesquisas realizadas com animais mostram os resultados positivos da prática de exercício físico moderado sob a infecção experimental por *T. cruzi* (Schebeleski-Soares et al. 2009; Soares et al. 2010; Occhi et al. 2012). No entanto, não estão disponíveis relatos de avaliação de alterações produzidas no plexo mientérico e na parede do cólon de camundongos submetidos ao exercício físico moderado e infectados por *T. cruzi*.

Sendo assim, este trabalho verificou a influência do exercício físico moderado sobre neurônios mientéricos e da parede do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi* relacionadas a aspectos parasitológicos e imunológicos da infecção.

Materiais e métodos

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação (CEAE), da Universidade Estadual de Maringá-Brasil (Parecer 046/2009).

Animais

O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio e repetido duas vezes. Foram utilizados em cada repetição 40 camundongos suíços machos, com 30 dias de idade, distribuídos em dois grupos: Treinados (n=20) e Sedentários (n=20).

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (dimensão 414 x 344 x 168mm) tampadas com grade zincada com depressão central para deposição da ração e garrafa de água. As caixas forradas com maravalha foram limpas duas vezes na semana, permanecendo em biotério climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas com água (clorada) e ração (Nuvilab Cr-1[®] da Nuvital[®]) disponíveis *ad libitum*.

Protocolo de exercício físico

Os animais com 30 dias de vida foram submetidos ao programa de exercício físico aeróbio em esteira rolante (*Inbrasport*[®] modelo *Classic CI*[®]), durante oito semanas, sendo composto por uma sessão diária de treinamento, cinco vezes na semana, com duração de 30 a 45 minutos com velocidade de seis a 14 m/min na primeira semana, 45 a 60 minutos e velocidade de oito a 16 m/min na segunda semana e 60 minutos com velocidade de 10 a 20

m/min nas demais (velocidade média de 13 m/min nas quatro primeiras semanas e de 17,5 m/min nas quatro últimas), com início a partir das 18h00m (ciclo escuro - respeitando o hábito noturno dos animais), temperatura entre 20 e 22° C. O protocolo de exercício físico que foi utilizado corresponde a um esforço moderado (Lerman et al. 2002; Schebeleski-Soares et al. 2009).

A esteira possui adaptador para treinamento de animais de pequeno porte e um sistema que permite a programação das sessões de treinamento e controle digital da velocidade com sensibilidade de dois metros por minuto (m/min). O treinamento foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Esforço do Departamento de Ciências Fisiológicas (LABFISE/DFS/UEM).

Não foram utilizados mecanismos de choque ou similares para induzir o animal a se exercitar, assim como foi adaptado um suporte de papelão na parte superior de cada raia para que os animais que se cansassem tivessem opção de descansar durante o treinamento.

Infecção

Após o término do programa de exercício físico, os animais foram redistribuídos em quatro grupos: Treinado Controle (TC) submetido ao exercício físico e não infectado (n=10); Treinado Infectado (TI) submetido ao exercício físico e posteriormente infectado (n=10); Sedentário Controle (SC) mantido sedentário e não infectado (n=10) e Sedentário Infectado (SI) mantido sedentário e posteriormente infectado (n=10).

Foi utilizado inóculo de 1300 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, (via i.p.) (Moreira et al. 2011). Os grupos TI e SI foram inoculados três dias após o término do programa de exercício físico. A infecção crônica foi obtida com cinco doses de BENZNIDAZOL (LAFEPE-PE/Brasil), três doses (100mg/Kg/m.c. aos 11, 15 e 22 dias após a inoculação, dpi) e duas doses (250mg/Kg/m.c. aos 18 e 41 dpi), via oral-gavagem.

Avaliação da evolução da infecção

A parasitemia foi avaliada em todos os animais infectados, utilizando a técnica de Brener (1962). A contagem de parasitos foi realizada diariamente do 4° ao 15° dias após a inoculação (dpi) e em dias alternados do 15° ao 61° dpi. A curva foi traçada utilizando a parasitemia média dos animais inoculados para cada grupo. Foram obtidos:

- ✓ Período pré-patente: tempo médio, em dias, entre o dia da inoculação experimental e o dia no qual foi observada positividade no exame de sangue a fresco para cada grupo;
- ✓ Período patente: tempo médio, em dias, que cada grupo apresentou parasitemia detectada no exame de sangue a fresco;
- ✓ Pico de parasitos: representado pelo maior número de parasitos observados em cada grupo a partir da curva de parasitemia média;
- ✓ Parasitemia total: média da soma do número de parasitos de cada animal;
- ✓ Mortalidade: foi anotada ao longo de todo o experimento por um período de 75 dias;
- ✓ Massa corporal dos animais: foi verificada uma vez por semana durante todo o experimento.

Eutanásia e coleta de órgãos

Aos 75 dias após a inoculação, todos os animais foram mortos com *overdose* de éter etílico. O cólon de cinco animais de cada grupo foi retirado e lavado com solução salina 0,85%, preenchido e imerso em solução fixadora de formol acético. Após 48h foram dissecados para confecção de preparados totais da túnica muscular e serosa, corados pela técnica de Giemsa (Barbosa 1978) para evidenciar a população neuronal mientérica total, a qual foi contada e mensurada. A área do cólon expressa em cm² foi calculada a partir da largura e comprimento de cada órgão coletado.

Análise quantitativa de neurônios mientéricos

Foram quantificados os neurônios presentes em 120 campos microscópicos distribuídos por toda a circunferência intestinal. Foi utilizado microscópio fotônico (Olympus CBA), com objetiva de 40X. A desnervação foi avaliada pela comparação entre grupo teste e controle, sendo expressa em porcentagem.

Análise morfométrica de neurônios mientéricos

Foi mensurada a área (μm^2) do corpo celular e do núcleo de 300 neurônios do plexo mientérico de cada animal distribuídos por toda a circunferência intestinal de cada animal. Por

isso, utilizou-se imagens capturadas em microscópio fotônico trinocular (MOTIC B5) acoplado a uma câmera de vídeo digital de alta definição (MOTICAM 2000). As medidas foram realizadas utilizando software Image-Pro Plus.

Análise histológica da parede intestinal

Foram obtidos três cortes histológicos transversais com 4 μm de espessura, de cinco animais de cada grupo, corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para quantificar linfócitos intra-epiteliais (LIE) e focos inflamatórios. Para análise de células caliciformes, Periodic Acid Schiff (PAS) foi utilizado para detecção de mucinas neutras; Alcian Blue (AB) pH 2,5+ para detecção de sialomucinas/ sulfomucinas e Alcian Blue (AB) pH 1,0+: para detecção de sulfomucinas (Myers et al. 2008). Para a coloração de PAS e AB realizou-se contracoloração com hematoxilina.

Análise morfométrica da parede intestinal

Imagens capturadas com aumento de 200X foram utilizadas para mensurar a espessura da túnica mucosa, profundidade e largura da cripta, tela submucosa e a túnica muscular, com aumento de 40X para medir a espessura total da parede, e aumento de 1000X para mensurar a altura de enterócitos e a área de seus núcleos. Oitenta (80) medidas foram realizadas para cada estrutura, distribuídas uniformemente em toda a circunferência intestinal, de cada camundongo. Foram utilizados cortes corados com HE e imagens capturadas com câmera digital (Moticam 2000 2.0 Megapixel) acoplada a microscópio de luz trinocular (MOTIC B5).

Análise quantitativa de linfócitos intra-epiteliais (LIE), células caliciformes e focos inflamatórios.

Foram quantificadas 2500 células epiteliais de cada animal e calculado a proporção de linfócitos/100 células epiteliais (Chot et al. 1997) e células caliciformes/100 células epiteliais (Hernandes et al. 2003), utilizando cortes corados com HE, PAS, AB pH 2,5+ e AB pH 1,0+.

Foram ainda quantificados os focos inflamatórios e o número de células inflamatórias do foco em 10 campos microscópicos com 1,9 mm² de área distribuídos em toda circunferência intestinal, na túnica muscular de três cortes histológicos de cada animal para obtenção da média. Foram considerados focos inflamatórios, grupos com 10 ou mais células inflamatórias (Oliveira et al. 2007). Foi utilizado microscópio fotônico (Olympus CBA), com aumento de 400X.

Dosagem de citocinas

Foram dosadas citocinas Interleucina-10 (IL-10), Interferon- γ (IFN- γ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Fator de crescimento transformador- β (TGF- β). No plasma de dez animais por grupo, pela técnica de ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) de captura, com pares de anticorpos da R&D system Inc[®] (Minneapolis-USA). As concentrações das citocinas foram determinadas com referência à curva padrão obtida com citocina murina recombinante. Os resultados foram expressos em pg/mL para IL-10, IFN- γ e TNF- α e em ng/mL para TGF- β .

Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada com o teste D`Agostino Pearson e/ou Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal foram expressos como média \pm desvio-padrão e comparados com o teste ANOVA-Tukey. Dados com distribuição não especificada foram expressos como mediana e percentis 25 e 75 (P25 e P75) e comparados com o teste Kruskal-Wallis e teste das Medianas. Foi utilizado nível de significância de 5% e o programa BioEstat 5.0[®]. Foi realizada estatística de efeito site (<http://www.uccs.edu/~lbecker/>), utilizando-se o teste *Effect size calculators*, verificando-se a intensidade do efeito do exercício físico em relação ao sedentarismo sobre a infecção murina por *T. cruzi*. O efeito foi considerado pequeno quando observado resultado $\leq 0,2$. Médio quando é observado efeito $> 0,2$ a $\leq 0,5$ e grande quando é observado efeito $> 0,5$.

Resultados

Evolução da infecção

A curva de parasitemia apresentou perfil característico da cepa Y de *T. cruzi* nos dois grupos infectados. O pico de parasitos no 8º dia de infecção e a parasitemia total foram 60,0% ($p < 0,05$) e 44,3% ($p < 0,05$) menores nos animais do grupo TI que o observado em animais do grupo SI. Não houve diferença estatística entre os grupos para infectividade, período pré-patente e período patente assim como para a mortalidade (Figura 1 e Tabela 1) ($p > 0,05$).

Durante a infecção a massa corporal dos animais manteve-se estável para os dois grupos ($p > 0,05$). Não houve alterações significantes no comprimento, diâmetro e área total do cólon dos camundongos avaliados ($p > 0,05$).

Análise quantitativa da população neuronal mientérica total

A Tabela 2 e Figura 2 detalham a comparação da população neuronal mientérica total entre os grupos estudados. O exercício físico protegeu a população neuronal mientérica total em 17,1%. Este dado é resultante da subtração do percentual da comparação de animais treinados (TC x TI = 22,0% - $p < 0,05$) menos o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 39,1% - $p < 0,05$).

Quando o número de neurônios foi projetado para a área total do cólon observou-se que o exercício físico impediu significativamente a morte da população neuronal mientérica total em 8,0%. Este número é resultante da subtração do percentual da comparação de animais treinados (TI x TC = 36,3% - $p < 0,05$) menos o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 44,1% - $p < 0,05$) (Tabela 2 e Figura 2). A proteção neuronal obtida foi confirmada pela estatística de efeito verificando-se “grande efeito” de 1,1 para a comparação (TI x SI).

Análise morfométrica da população neuronal mientérica total

O exercício físico e a infecção nos animais treinados (TI x TC) promoveram aumento de 30,0% da área nuclear, 82,1% da área citoplasmática e conseqüentemente 59,2% da área do corpo neuronal ($p < 0,05$). Nos animais sedentários (SI x SC) a infecção promoveu aumento de 27,2% da área nuclear, 55,0% da área citoplasmática e conseqüentemente 40,2% da área do

corpo neural ($p < 0,05$). O resultado da subtração entre os valores (59,2 – 40,2) fornece o benefício do exercício físico sobre neurônios mientéricos em animais infectados que foi de 19,5% que significa “médio efeito” de 0,4 (Tabela 3).

Análise morfométrica da parede intestinal

O exercício físico não provocou alterações sobre a espessura da túnica mucosa, altura do enterócito e a área de seu núcleo, profundidade e largura da cripta, tela submucosa e túnica muscular, quando comparados animais dos grupos TI e SI. Contudo, o exercício físico provocou aumento da espessura total da parede intestinal de 7,3% (TI x SI - $p < 0,05$). Nos animais sedentários a infecção por *T. cruzi* provocou redução da espessura total da parede intestinal de 6,7% (SI x SC - $p < 0,05$) (Tabela 4).

Número de linfócitos intra-epiteliais (LIE), células caliciformes e focos inflamatórios

A infecção nos animais treinados promoveu aumento de 44,7% ($p > 0,05$) no número de LIE. Nos animais sedentários a infecção promoveu redução no número de LIE de 39,0% ($p > 0,05$). O resultado da subtração entre estes valores (44,7 – 39,0) fornece o benefício do exercício físico em animais infectados que foi de 5,7% que significa “grande efeito” de 1,2 (Tabela 5).

O número de células caliciformes nos animais treinados reduziu significativamente, independentemente dos animais estarem infectados ou não. No grupo onde ocorreu interação do exercício físico e a infecção (TI), o exercício foi responsável pela redução de 2,0% no número de células PAS-reativas. Este número é resultante da subtração do percentual da comparação de animais treinados (TC x TI = 9,0% - $p < 0,05$) menos o percentual da comparação entre animais sedentários (SC x SI = 7,1% - $p < 0,05$) (Tabela 5). A redução do número de células caliciformes pelo exercício físico obtida foi confirmada pela estatística de efeito verificando-se “grande efeito” de 5,4 para a comparação (TI x SI).

Da mesma forma, foi observado nas sialomucinas e sulfomucinas (AB pH 2,5) e sulfomucinas (AB pH 1,0) reativas. O exercício físico foi responsável pela redução de 15,5% (TC x TI = 20,0% - SC x SI = 2,5% - $p < 0,05$) e 18,0% (TC x TI = 18,0% - SC x SI = 0,0% - $p < 0,05$) (Tabela 5), que foi confirmada pela estatística de efeito verificando-se “grande efeito” de 4,0 e 3,0 para a comparação (TI x SI).

O número de focos inflamatórios na túnica muscular intestinal dos animais TI foi 64,5% menor que nos animais SI ($p < 0,05$) sendo que o exercício físico foi responsável pela prevenção de 72,2% ($(TI-TC \times 100 \text{ dividido por } SI-SC)$) na formação do número de focos inflamatórios (Figura 3 e 4), confirmado pela estatística de efeito verificando-se “grande efeito” de 1,8 para a comparação (TI x SI).

Dosagem de citocinas

A Figura 5A mostra a comparação dos grupos para a produção de TNF- α . O exercício físico proporcionou aumento significativo da síntese de TNF- α de 18,0% ($p < 0,05$). Este dado é resultante da variação entre o percentual de comparação de animais treinados ($TC \times TI = 23,4\%$ - $p < 0,05$) e o percentual da comparação entre animais sedentários ($SI \times SC = 41,3\%$ - $p < 0,05$), confirmado pela estatística de efeito onde foi verificado “grande efeito” de 1,3 para a comparação (TI x SI).

A Figura 5B apresenta a comparação dos grupos para a produção de TGF- β . O exercício físico proporcionou aumento não significativo da síntese de TGF- β em 18,0%. Este dado é resultante da variação entre o percentual da comparação de animais treinados ($TC \times TI = 21,4\%$ - $p < 0,05$) e o percentual da comparação entre animais sedentários ($SI \times SC = 39,0\%$ - $p < 0,05$), com “grande efeito” de 0,7 para esta comparação. Não foram observados níveis detectáveis para IFN- γ e IL-10, nas condições experimentais avaliadas.

Discussão

Este é o primeiro estudo realizado para verificar a influência do exercício físico moderado sobre neurônios mientéricos e da parede do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi* considerando aspectos parasitológicos e imunológicos da infecção.

Os parâmetros parasitológicos mostraram que exercício físico moderado modificou a evolução da infecção em relação ao sedentarismo. O pico de parasito e a parasitemia total foram significativamente menores no grupo TI em relação ao observado em animais do grupo SI.

Estes resultados concordam com os de Schebeleski-Soares et al. (2009) que observaram redução no pico de parasitos em camundongos BALB/c fêmeas treinadas e infectadas com a cepa Y de *T. cruzi*. No presente trabalho não foi observado diferença

significante na massa corporal dos animais entre os grupos TI e SI provavelmente devido ao equilíbrio do sistema imunológico associado à prática do exercício físico e, ao tratamento descontínuo com benzonidazol para cronificação da infecção. Este fármaco, embora não apresente completa eficácia de cura, impede a evolução da parasitemia que é uma das causas de morbidade da infecção por *T. cruzi* (Ministério da Saúde 2009; Hasslocher et al. 2012). Os dados sugerem que o exercício físico esteja agindo sobre algum mecanismo regulatório de controle imunológico da parasitemia.

A modificação da evolução da infecção pelo exercício físico conferiu proteção significativa à população neuronal mientérica total tanto na área amostral estudada (17,1%), quanto para a projeção do número de neurônios na área total do cólon (8,0%). Ambos os dados resultaram em “grande efeito” do exercício sobre a população neuronal. Em estudo anterior, Moreira et al. (2011) observaram que a infecção por *T. cruzi* promove redução da população neuronal mientérica total maior que 50,0% e que esta redução é dependente do tamanho do inoculo que reflete a parasitemia. Neste estudo, como o exercício físico diminuiu a parasitemia, proporcionou proteção neuronal.

Os animais do grupo TC, apresentam porcentual neuronal significativamente maior que os demais grupos. Os dados neuronais obtidos nos grupos TC e SC estão de acordo com a preservação neuronal observada por outros autores (Brito Mari et al. 2008; Gagliardo et al. 2008).

Quanto à morfometria neuronal mientérica, os animais treinados infectados apresentaram neurônios com aumento significativo da área do corpo neuronal devido o aumento da área nuclear e citoplasmática, confirmada pela estatística de efeito como “médio efeito” de 0,4. Esta alteração é sugestiva de aumento da expressão gênica para maior produção de proteínas em neurônios colinérgicos e nitrérgicos, relativa à síntese das enzimas colina-acetiltransferase e óxido nítrico sintase neuronal, para formação ativa da acetilcolina, responsável pela contração muscular intestinal e do óxido nítrico, relacionado à dilatação muscular intestinal (Furnes e Costa 2006). Neste contexto, o aumento observado contribuiu para a adaptação fisiológica, com melhora da condição do animal a nível celular, indicando que a prática do exercício físico moderado melhora o controle do peristaltismo intestinal em animais infectados por *T. cruzi*.

A doença de Chagas é caracterizada por um processo inflamatório generalizado (Lana and Tafure apud Neves 2011). Silveira et al. (2007) observaram no plexo mientérico do cólon de pacientes chagásicos portadores de megacólon, aumento da frequência de neurônios

excitatórios produtores de substância P, que quando secretada contribui para a neurogênese da inflamação (Winters et al. 1995). Da mesma forma, Silveira et al. (2007) encontraram altos níveis de substância P em pacientes com megacolo chagásico. No presente trabalho, sugere-se que a hipertrofia de neurônios possa estar relacionada com este marcador neuroquímico. A literatura relata que a capsaicina (componente ativo da pimenta) estimula a liberação da substância P. No entanto, o uso contínuo desta substância leva à depleção da própria substância P (Costa 2013).

Os indivíduos portadores da doença de Chagas encontram-se perdidos no sistema de saúde brasileiro (SUS-Sistema Único de Saúde), sem um caminho direcionado de atendimento (Jubert 2009). Sendo assim, parece bastante interessante associar o exercício físico moderado como parte do tratamento da constipação crônica em indivíduos infectados na rede pública, para atuar como efeito estimulante do trânsito intestinal (Oettle 1991). Ainda, a literatura apresenta evidências para sustentar a hipótese de que o uso contínuo da capsaicina pode apresentar benefícios a pacientes chagásicos por diminuir a síntese da substância P e conseqüentemente minorar a morbidade, pela diminuição do processo inflamatório generalizado (Costa 2013).

Na doença de Chagas os distúrbios de motilidade estão associados à constipação e dilatação de vísceras, acompanhados ou não de espessamento da parede intestinal (Silveira 2007). Este é o primeiro estudo que investiga a morfologia da parede intestinal em animais treinados e posteriormente infectados por *T. cruzi*, onde observou-se aumento significativo na espessura da parede total, comparando-se TI x SI e TI x TC, respectivamente.

Além disso, os animais treinados apresentaram redução significativa da proporção de células caliciformes em relação ao número de enterócitos. No grupo TI, o exercício moderado reduziu significativamente o número de células (PAS-reativas), com “grande efeito” de 5,4, para aquelas que produzem sialomucinas e sulfomucinas - ácidas (AB pH 2,5+) com “grande efeito” de 4,0 e para as sulfomucinas - ácidas (AB pH 1,0+) com “grande efeito” de 3,0 em relação ao grupo SI. As mucinas compõem o muco, que recobre o epitélio intestinal protegendo-o (Myers et al. 2008). No caso deste estudo, a redução da secreção de mucinas no epitélio intestinal nos animais treinados, infectados ou não por *T. cruzi*, provavelmente deveu-se ao fato do exercício físico moderado ter inibido o desenvolvimento da parasitemia, impedindo a formação de processo inflamatório, mostrando que não havia necessidade de aumentar a secreção de mucinas, indicando que o muco que cobria o epitélio estava cumprindo seu papel a contento.

Nos animais sedentários e infectados, as células caliciformes que secretam mucinas neutras (PAS+) aumentaram significativamente a secreção em resposta à infecção por *T. cruzi*. Durante um processo infeccioso na mucosa intestinal as células caliciformes aumentam suas descargas liberando secreção (Furlan et al. 2004). Os componentes das mucinas funcionam como falsos receptores para microorganismos, fazendo com que os mesmos sejam envolvidos pela camada de muco diminuindo sua capacidade patogênica (Furlan et al. 2004).

Observou-se redução significativa no número de focos inflamatórios em animais do grupo TI em relação aos animais SI, sendo que o exercício físico moderado foi responsável pela prevenção na formação de focos inflamatórios mostrando “grande efeito” de 1,8. Este resultado certamente está relacionado ao menor número de parasitos observado em animais treinados. De acordo com a literatura (Silveira 2007), a grande maioria das células inflamatórias encontradas nas camadas musculares de pacientes chagásicos são leucócitos mononucleares que possuem potencial citotóxico. Estes leucócitos quando ativados por *T. cruzi*, liberam substância tóxica levando a destruição das células dispostas nas camadas musculares sugerindo a participação das mesmas no processo de inflamação e desnervação induzido pela infecção por *T. cruzi*. Os dados aqui obtidos sustentam a hipótese levantada por (Silveira 2007), visto que o número de focos inflamatórios presentes nos animais do grupo SI estava significativamente aumentado em relação ao grupo SC, expressando “grande efeito” da infecção, implicando em redução significativa do número de neurônios mientéricos (SI x SC).

É importante destacar que a redução do número de focos inflamatórios no grupo TI é observado concomitante ao aumento significativo da síntese de TNF- α , em relação aos animais do grupo SI. Da mesma forma, o exercício físico moderado proporcionou aumento significativo da síntese de TNF- α quando comparados animais treinados com sedentários. Aumento este confirmado pela estatística de efeito (“grande efeito” de 1,3) O TNF- α possui um importante papel na modulação da resposta imune, conferindo resistência à infecção por *T. cruzi* (Abbas et al. 2008). Ainda, concentrações elevadas de TNF- α induzem a caquexia, sendo esta é um importante preditor de perda de massa corporal (Anker e Coats 1999).

O TGF- β e IL-10 são citocinas com capacidade de regular a resposta imune do hospedeiro, particularmente as que envolvem macrófagos (Abbas et al. 2008). Os animais treinados e infectados (TI) apresentaram aumento da síntese de TGF- β em 18,0%, significando “grande efeito” na comparação TI x SI, enfatizando a importância da prática do exercício físico moderado para a regulação imune e controle da ativação de macrófagos em resposta às alterações fisiológicas decorrentes da infecção por *T. cruzi*. Em fragmentos de

necropsia de miocárdio de humanos com cardiopatia chagásica crônica e insuficiência cardíaca congestiva, o TGF- β estava pouco expresso, sugerindo algum fator inibitório atuando sobre macrófagos, podendo corresponder à imunodepressão devido à presença de *T. cruzi* (Reis et al. 2000).

Em conclusão, o exercício físico moderado altera a evolução da infecção diminuindo parasitemia na fase aguda da infecção experimental de camundongos por *T. cruzi*, protege a população neuronal mientérica total e induz a hipertrofia de neurônios, significando melhor prognóstico para o animal cronicamente infectado com relação à manutenção do peristaltismo intestinal. Além disso, provoca aumento da espessura total da parede intestinal, aumento do número de LIE, redução da proporção de células caliciformes e do número de focos inflamatórios e aumento da síntese de TNF- α e TGF- β . Estes resultados aprofundam a fundamentação já consistente dos benefícios do exercício físico moderado e fortalecem a necessidade de implantação de atividade física como opção de tratamento complementar direcionado a indivíduos infectados cronicamente por *T. cruzi*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* e *Fundação Araucária* do Paraná, pelo apoio financeiro.

TABELAS E FIGURAS

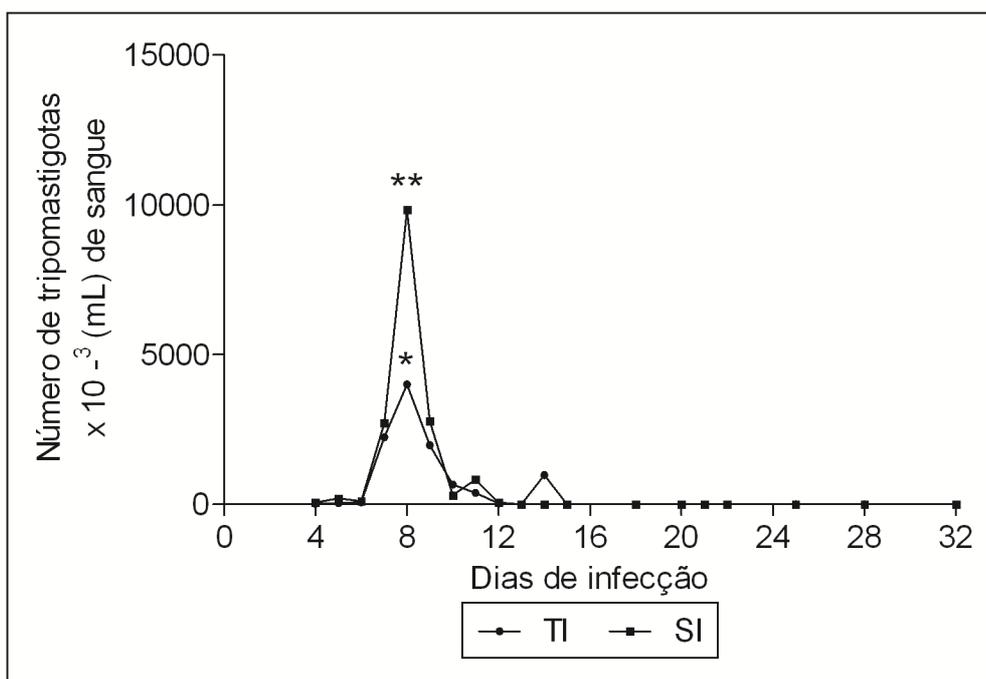


Figura 1. Curva de parasitemia média de camundongos suíços machos, após 12 semanas de idade, submetidos ao exercício físico e posteriormente infectados (TI) ou mantidos sedentários e posteriormente infectados (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. Símbolos diferentes (*,**) apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) entre TI e SI no oitavo dia após a infecção. Teste: Mann-Whitney.

Tabela 1. Parâmetros parasitológicos avaliados em camundongos, suíços, machos, após 12 semanas de idade submetidos ao exercício físico e posteriormente infectados (TI) e mantidos sedentários e posteriormente infectados (SI) com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| Grupo | Infectividade (%) | Período Pré-Patente (dias) | Período Patente (dias) | Pico de Parasitos (tripomastigotas/mL X 10 ⁶) | Parasitemia Total (tripomastigotas/mL X 10 ⁶) |
|-------------|-------------------|----------------------------|------------------------|---|---|
| TI (n = 10) | 100 | 5,0 ± 1,1 | 13,0 ± 8,0 | 4,0 ± 3,4 | 9,4 ± 4,6 |
| SI (n = 10) | 100 | 4,2 ± 0,4 | 13,4 ± 9,0 | 9,8 ^a ± 6,3 | 16,9 ^b ± 9,5 |

(n = número de animais) Data shown as mean ± standard deviation. Comparisons between TI and SI. ($p < 0,05$). Teste: Mann-Whitney.

Tabela 2. Densidade neuronal mientérica* do cólon de camundongos, suíços machos, com 22 semanas de idade, Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| | Grupo | | | |
|---|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | TC (n = 5) | TI (n = 5) | SC (n = 5) | SI (n = 5) |
| Densidade neuronal em 45,6 mm ² | 10.049,3 ^a ± 568.4 | 7.835,0 ^b ± 496.8 | 7.711,4 ^b ± 610.0 | 4.689,6 ^c ± 230.0 |
| Projeção do número de neurônios para a área do cólon X 10 ⁻⁷ | 88,6 ^d ± 6,0 | 56,4 ^e ± 24,4 | 54,6 ^f ± 4,9 | 30,5 ^g ± 21,0 |

*Em 240 campos microscópicos com 45,6 mm² de diâmetro. (n = número de animais). Dados apresentados como média ± desvio-padrão seguidos de letras diferentes numa mesma linha apresentam diferença significativa (<0,05). Teste: ANOVA-Tukey.

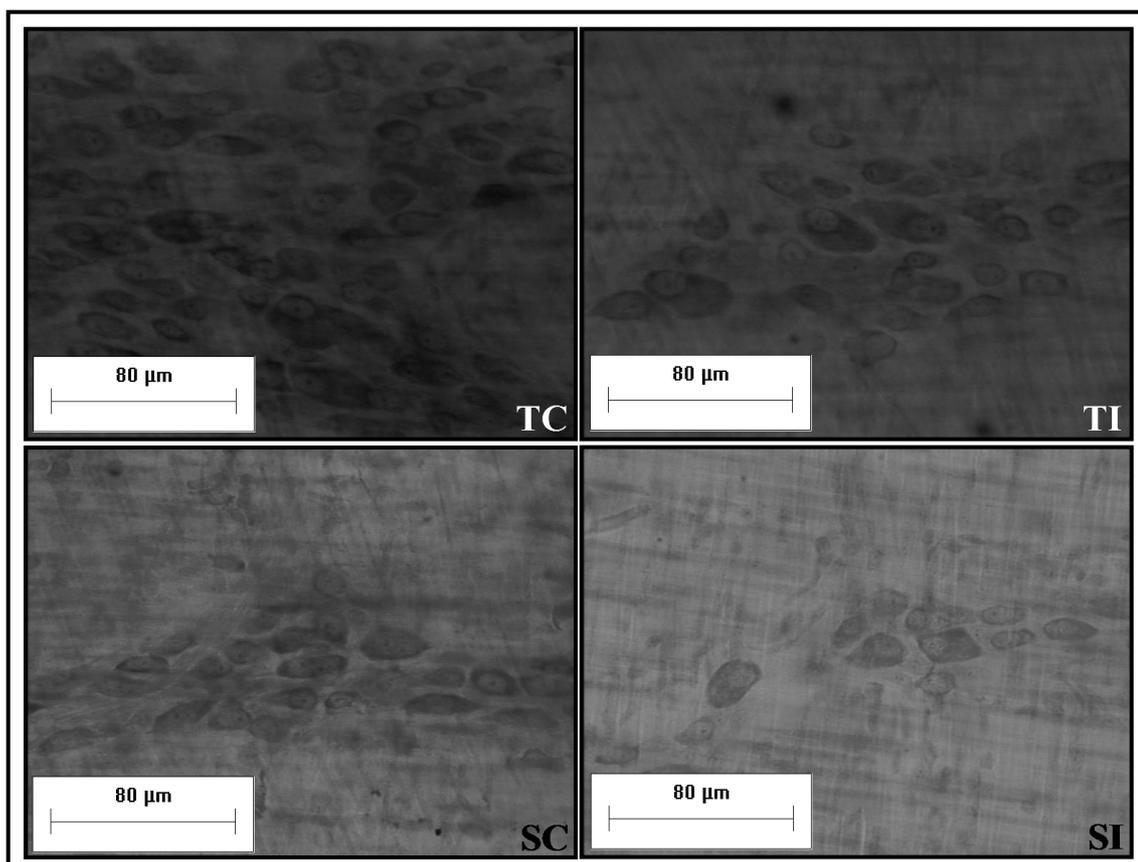


Figura 2. Microfotografia mostrando gânglio mientérico no cólon de camundongos, suíços, machos, com 22 semanas de idade corados com a técnica de Giema. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias. Microscópio fotônico (MOTIC B5), 200 X. Teste: ANOVA-Tukey.

Tabela 3. Morfometria de neurônios mientéricos do cólon de camundongos suíços, machos, com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| Parâmetro | Grupo | | | |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | TC (n = 5) | TI (n = 5) | SC (n = 5) | SI (n = 5) |
| Área do Núcleo (μm^2) | 53,5 ^a (40,8; 69,6) | 69,6 ^b (54,3; 89,4) | 45,8 ^c (34,4; 60,0) | 58,3 ^d (44,2; 76,6) |
| Área do Citoplasma (μm^2) | 75,2 ^a (50,0; 116,6) | 137,0 ^b (92,3; 225,7) | 64,0 ^c (42,2; 98,8) | 99,2 ^d (66,5; 155,2) |
| Área do Corpo celular (μm^2) | 131,8 ^a (98,3; 180,7) | 209,9 ^b (160,7; 310,3) | 113,8 ^c (81,0; 155,5) | 159,6 ^d (118,0; 229,2) |

(n = número de animais). Valores apresentados como mediana percentil (25; 75) seguidos de letras diferentes numa mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Teste: Kruskal-Wallis.

Tabela 4. Análise morfométria da parede intestinal do cólon de camundongos suíços, machos, com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| Medidas | TC (n = 5) | TI (n = 5) | SC (n = 5) | SI (n = 5) |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Túnica mucosa (μm) | 156,2 ^a (126,3; 181,0) | 156,3 ^a (133,2; 179,2) | 149,3 ^b (124,3; 174,1) | 156,1 ^a (131,3; 179,1) |
| Altura do enterócito (μm) | 24,2 ^a (23,1; 25,3) | 23,1 ^b (22,4; 25,4) | 23,4 ^b (22,4; 25,3) | 23,2 ^b (22,1; 25,1) |
| Área do núcleo do enterócito (μm^2) | 23,2 ^a (21,4; 24,4) | 23,5 ^a (20,3; 24,4) | 23,9 ^b (21,3; 25,1) | 23,4 ^a (22,9; 25,7) |
| Profundidade da cripta (μm) | 89,0 ^a (86,3; 94,4) | 90,3 ^a (86,4; 95,5) | 92,3 ^b (85,2; 97,3) | 90,5 ^a (87,0; 95,3) |
| Largura da cripta (μm) | 25,5 ^a (23,4; 28,2) | 24,4 ^a (23,3; 26,0) | 24,3 ^{bc} (22,6; 26,3) | 24,4 ^{bac} (23,3; 26,1) |
| Tela submucosa (μm) | 21,0 ^a (18,2; 25,2) | 22,1 ^{ba} (18,0; 25,2) | 23,2 ^{bc} (20,4; 26,5) | 22,2 ^a (18,0; 24,4) |
| Túnica muscular (μm) | 207,2 ^a (180,3; 252,2) | 221,4 ^a (179,3; 249,2) | 232,3 ^b (204,2; 256,5) | 220,1 ^a (176,2; 244,1) |
| Parede total (μm) | 455,3 ^a (370,2; 657,0) | 482,2 ^b (420,1; 702,0) | 476,1 ^b (420,2; 701,4) | 449,1 ^a (370,2; 624,1) |

(n = número de animais). Valores apresentados como mediana percentil (25; 75) seguidos de letras diferentes numa mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Teste: Kruskal-Wallis.

Tabela 5. Proporção de linfócitos/100 células epiteliais e células caliciformes/100 células epiteliais da túnica mucosa do cólon de camundongos suíços, machos, com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| Grupo | Linfócitos | | Células caliciformes | |
|------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | HE | PAS | AB pH 1,0 | AB pH 2,5 |
| TC (n = 5) | 2,38 ± 0,95 | 0,44 ^a ± 0,01 | 0,45 ^a ± 0,01 | 0,44 ^a ± 0,01 |
| TI (n = 5) | 3,33 ± 1,10 | 0,48 ^b ± 0,01 | 0,54 ^b ± 0,01 | 0,52 ^b ± 0,01 |
| SC (n = 5) | 3,62 ± 1,54 | 0,56 ^c ± 0,02 | 0,57 ^c ± 0,01 | 0,55 ^c ± 0,01 |
| SI (n = 5) | 2,21 ± 0,72 | 0,60 ^d ± 0,03 | 0,58 ^c ± 0,01 | 0,55 ^c ± 0,01 |

H.E: Hematoxilina e eosina; P.A.S: periodic-acid-chiff; AB: Alcian blue. (n = número de animais). Médias ± desvios padrões seguidos de letras diferentes numa mesma coluna apresentam diferença estatisticamente significantes (p<0,05). Teste: ANOVA-Tukey.

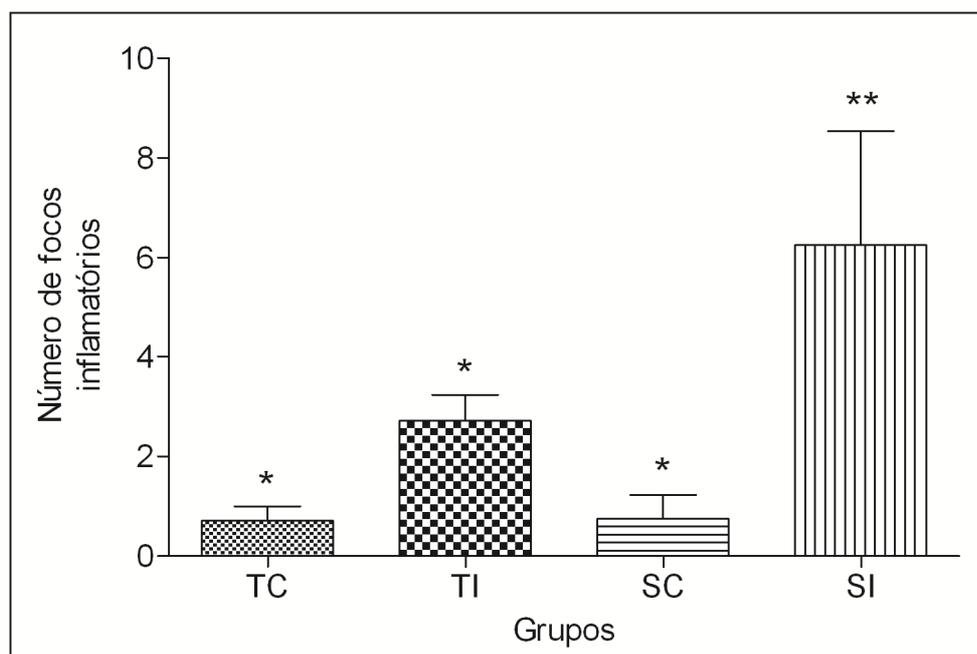


Figura 3 Média e desvio-padrão de focos inflamatórios na túnica muscular de camundongos suíços, machos, com 22 semanas de idade. Treinados Controles (TC; n=5), Treinados infectados (TI; n=5), Sedentários Controles (SC; n=5) e Sedentários Infectados (SI; n=5). Infecção com 1300 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* durante 75 dias. (n = número de animais). Símbolos diferentes (*, **) representam diferença estatística entre os quatro grupos (p<0,05). Teste: ANOVA-Tukey.

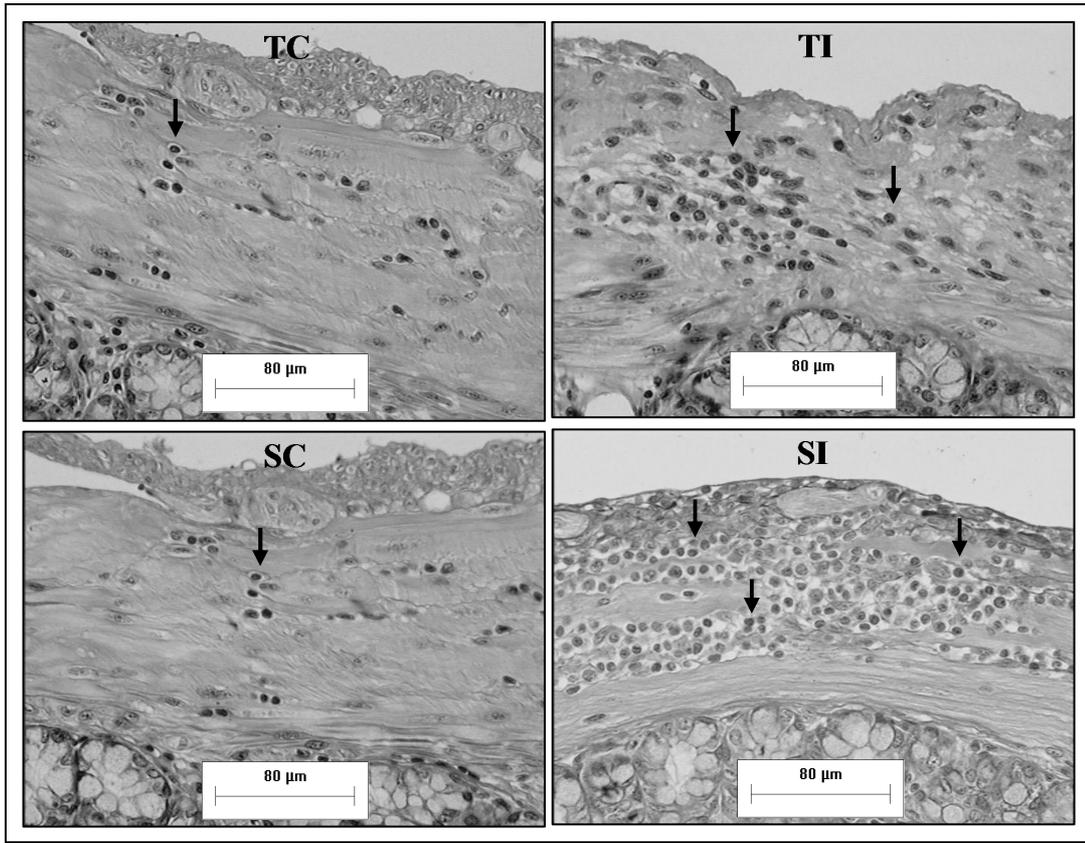


Figura 4. Microfotografia mostrando células inflamatórias (seta), na túnica muscular intestinal de camundongos suíços machos, com 22 semanas de idade, Treinados Controles (TC; n=5), Treinados Infectados (TI; n=5), Sedentários Controles (SC; n=5) e Sedentários Infectados (SI; n=5). Infecção com 1300 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* durante 75 dias. (n = número de animais). (TC x SC x TI x SI) = (p <0,05). HE photonic microscope (MOTIC B5), 200 X. Teste: ANOVA-Tukey.

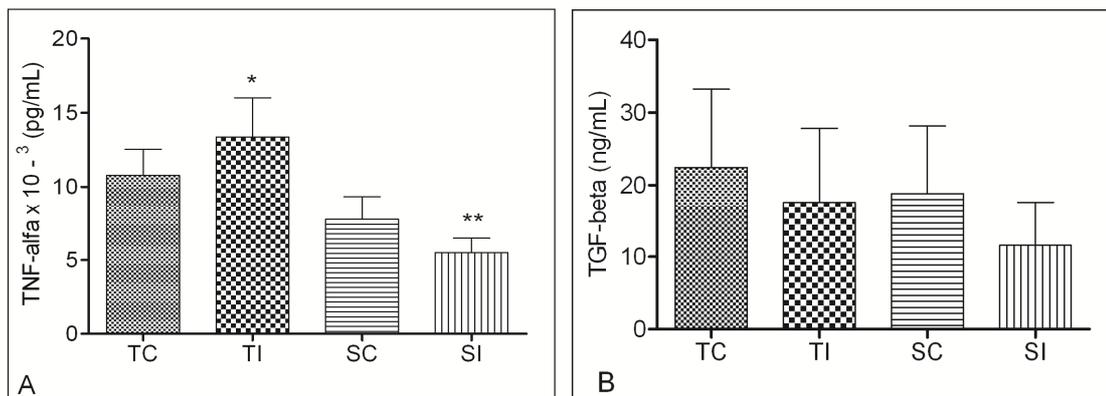


Figura 5. Média e desvio-padrão dos níveis detectados das citocinas: (A) TNF- α e (B) TGF- β em camundongos suíços machos, com 22 semanas de idade, Treinado Controle (TC; n=10), Treinado Infectado (TI; n=10), Sedentário Controle (SC; n=10) e Sedentário Infectado (SI; n=10), infectado com 1300 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* durante 75 dias. (n = número de animais). (A) símbolos diferentes (*, **) representam diferença estatística entre os quatro grupos ($p < 0,05$). Teste: Kruskal-Wallis.

Referências

- Abbas k.A., Litchman A.H. & Pillai S. (2008) *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Anker S.D. & Coats A.J. (1999) Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest*. 115, 836-847.
- Araujo S.M., Ando M.H., Cassarotti D.J., Mota D.C.G.D., Borges S.M. & Gomes M.I. (2000) Programa ACHEI: Atenção ao Chagásico com Educação Integral no município de Maringá e região noroeste do Paraná, Brasil. *Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.* 33, 565-572.
- Barbosa A.J.A. (1978) Técnica histoquímica para gânglios nervosos intramurais e preparados espessos. *Ver. Bras. Pes. Méd. Biol.* 11, 95-97.
- Brener Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Méd. Trop.* 4, 389-396.
- Britto Mari R., Clebis N.K., Gagliardo K.M., Guimarães J.P., Stabile S.R. & De Mello Germano R. (2008) Effects of exercise on the morphology of the myenteric neurons of the duodenum of Wistar rats during the ageing process. *Anat Histol Embryol.* 37, 289-295.
- Chott A., Gerdes D., Spooner A., Mosberger I., Kummer J.A., Ebert E.C. et al. (1997) Intraepithelial lymphocytes in normal human intestine do not express proteins associated with cytolytic function. *Am. J. Pathol.* 151, 435-442.

Costa G.V. (2013) Pimenta – Qual sua importância para a alimentação? Disponível em:

<http://nutricaoadia.wordpress.com/category/capsaicina/page/3/>; Acessado em: 03-07-2013.

Fabbro D.L., Streiger M.L., Arias E.D., Bizai M.L., Del Barco M. & Amicone N.A. (2007)

Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fé City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Ver. Soc. Brás. Méd. trop.* 40, 1-10.

Furlan R.L., Macari M. & Luquetti B.C. (2004) Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos,

probióticos e flora de exclusão competitiva. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais1004_acave_furlan.pdf. Acessado em: 16-04-2013.

Furnes J.B. & Costa M. (2006) *The enteric nervous system*. New York: Churchill livinestone.

Gagliardo M.K., Clebis N.K., Stabile S.R., De Britto Mari R., De Sousa J.M. & De Souza

R.R. (2008) Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. *Auton Neurosci.* 141, 31-37.

Hasslocher-Moreno A.M., do Brasil P.E., de Sousa A.S., Xavier S.S., Chambela M.C. & da

Silva G.M. (2012) Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 5, 1261-1266.

- Hernandes L., Pereira L.C. & Alvares E.P. (2003) Goblet cell number in the ileum of rats denervated during suckling and weaning. *Biocell*. 27, 347-351.
- Jubert C. (2009) Chagas: one hundred years later, *Bull World Health Organ*. 87, 491–492.
- Lana M. & Tafure W.L. (2011) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas In: Neves D.P., De Melo A.L., Linardi P.M. & Vitor R.W.A. *Parasitologia humana*. 12^a. ed. São Paulo: Atheneu. cap.11, pp 89-114.
- Lerman I., Harrison B.C., Freeman K., Hewett T.E., Allen D.L., Robbins J. et al. (2002) Genetic Variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J. Appl. Physiol*. 92, 2245-2255.
- Ministério da Saúde. (2009) *Cadernos de Atenção Básica: vigilância em saúde*. 13-45.
- Moreira N.M., Sant`Ana D.M.G., Araújo E.J.A., Toledo M.J.O., Gomes M.L. & Araújo S.M. (2011) Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: an experimental model. *An. Acad. Bras. Ciênc*. 83, 545-555.
- Myers B.M., Fredenburgh J.L. & Grizzle W.E. (2008) Carbohydrates. In: Bancroft J.D. & Gamble M. (Eds). *Theory and practice of histological techniques*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier; cap. 11, pp. 161-187.

Nakamura S., Kobayashi M., Sugino T., Matoba R. & Matsubara K. (2010) Effect of exercise on gene expression profile in unfractionated peripheral blood leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1, 846-851.

Occhi R.C., Soares C.S., Franzói-De-Moraes S.M., Batista M.R., Kwabara H.N., Sousa A.M.R. et al. (2012) Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. *Ver. Brás. Méd. Esp.* 18, 51-57.

Oettle G.J. (1991) Effect of moderat exercise on bowel habit. *Gut.* 8, 941-944.

Oliveira G.M., Diniz R.L., Batista W., Batista M.M., Bani Correa C., de Araújo-Jorge T.C. et al. (2007) Faz ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 171, 79-86.

Pallisera A., Ortiz-De-Zárate L., Moral A., Rey F., López S., López M.C. et al. (2011) Chagas' disease in the differential diagnosis of megacolon. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 10, 554-555.

Portal da Saúde. (2013) Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454.
Acessado em: 08-01-2013.

Reis M.M., Higuchi M.L., Aiello V.D. & Benvenuti L.A. (2000) Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. *ver. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 509-518.

- Rosa L.F.B.P.C. & Júnior M.L.B. (2005) Efeito do treinamento físico modulador positivo nas alterações no eixo neuroimunoendócrino em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica: possível atuação do fator de necrose tumoral- α . Ver. Brás. Méd. Esp. 11, 238-242.
- Santos Júnior J.C.M. (2002) Megacólon-Parte II: Doença de Chagas. Ver Brás Coloproctol 4, 266-277.
- Schebeleski-Soares C., Occhi R.C., De Moraes F., Marta S.D., De Oliveira M. & Almeida F.N. (2009) Pre-infection aerobic treadmill training improves resistance against. Appl. Physiol. Nut. Metab. 34, 659-665.
- Schmunis G.A. & Yadon Z.E. (2010) Chagas' disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta. Trop. 115, 14-21.
- Silveira A.B.M. (2007) Estudo estrutural dos componentes do sistema nervoso entérico e de células inflamatórias: uma contribuição à imunopatologia do megacólon chagásico. Belo Horizonte. (Tese de Doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais).
- Silveira A.B.M., Lemos E.M., Adade S.J., Oliveira R.C., Furnes J.B. & Reis D.D. (2007) Megacolon in Chagas' disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. Hum. Pathol. 38, 1256-1264.
- Soares C.S., Occhi R.C., Carvalho L.G.L., Moraes S.M.F., Dalálio M.M.O. & Araújo S.M. (2010) Produção de fator de necrose tumoral-alfa e peróxido de hidrogênio na infecção

pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos ao exercício. Acta. Scientiarum. Healh. Scinces. 32, 57-60.

WHO, World Health Organization. (2013) Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 08-01-2013.

Winters J., Bevan S. & Campbell E.A. (1995) Capsaicin and pain mechanisms. Britishh. J. Anesthesia. 75, 157-168.

APÊNDICE

Parecer emitido pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, para a liberação do desenvolvimento do projeto da tese



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 5 /5 /2009 Parecer nº 046/2009

Pesquisador: Silvana Marques de Araujo Setor: DAC
Título: Protocolo nº 015/2009
Influência do treinamento físico na infecção experimental pelo Trypanossoma cruzi em camundongos

Entrada: 27/3/2009 Início: 8/6/2009 Término: 7/6/2011
Situação do Projeto: **Aprovado**
Relatório Final: **Aguarda finalização do projeto**

ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.

Considerações e Parecer:

A pesquisadora proponente alterou o formulário e ainda teve a delicadeza de destacar em amarelo as alterações.

Parecer:
Aprovado.



Dr.ª Vânia Antunes

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:
I - aprovado;
II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
IV - não aprovado

www.ppg.uem.br - e-mail: ceeae@uem.br

ANEXOS

Author Guidelines - International Journal of Experimental Pathology

Ethics

The International Journal of Experimental Pathology (IJEP) encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). More information on various issues relating to Publication Ethics are dealt with in the relevant sections below and are outlined in full in the separate document Ethical Policies of the International Journal of Experimental Pathology. Submitted work must comply with these policies, which are based on the Best Practice Guidelines on Publication Ethics: a Publisher's Perspective (Graf C, Wager, E, Bowman A et al. Int J Clin Pract 2007;61[s152]:1-26) and the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their Code of Conduct. IJEP is a member of the Committee on Publication Ethics.elf Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors (defined below) have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with Ethical Policies of the Journal, and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Animal and Human Studies

Manuscripts describing studies involving animals should comply with local/national guidelines governing the use of experimental animals and must contain a statement indicating that the procedures have been approved by the appropriate regulatory body. Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the Declaration of Helsinki, and that the procedures have been approved by a local ethics committee. If individuals might be identified from a publication (e.g. from images) authors must obtain explicit consent from the individual.

Disclosures

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. Upon acceptance for publication, all authors should supply this information, to the Journal's Editorial Assistant, Biljana Nikolic at b.nikolic@ucl.ac.uk.

All sources of funding must be disclosed in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript and attribute the funding to appropriate authors.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

Authorship

All authors must fulfil the following three criteria:

- Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data,
- Drafting the paper or revising it critically, and
- Approval of the submitted and final versions

Submission

All submitted articles are subject to review by experienced referees. The Editors then select and accept manuscripts suitable for publication - the Editors' decisions are final. Manuscripts accepted for publication are copyedited and typeset. The proofs are finally sent to contributors for a final check, but extensive changes to the proofs may be charged to the contributors.

Online submission

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijep>

To submit you will require a user ID and password, which can be obtained on first use of the submission web site. Full instructions are provided when you enter the website. All file types are supported, but to help Editors and reviewers view the submission the following types are recommended:

Text: Microsoft Word or generic rich text format (RTF).

Figures: TIFF is preferred. JPEG, GIF, EPS, PNG Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel are also acceptable.

*Update (25 May 2012): Please note that we now accept .doc and .docx files.

It is strongly recommended that, where possible, you combine all parts of your submission into a single document. Alternatively you may submit the text of the manuscript (including front page, summary, body of text, references and legends to tables and figures) as one document, with tables and figures as a separate file.

Full help and support for on-line submissions are provided by e-mail (support@scholarone.com), or via the website (<http://blackwellsupport.custhelp.com>) or telephone (+ 1 434-817-2040 ext. 167).

Hardcopy submission

If online submission is not possible, authors should send original papers to the editor at the address below.

The Editor, Professor D.R. Katz
International Journal of Experimental Pathology
Division of Infection and Immunity
University College London
Cruciform Building
Gower Street
London WC1E 6BT, UK
Email: b.nikolic@ucl.ac.uk
Tel: 020 3108 2122 Fax: 020 3108 2123

Conditions of acceptance

Papers are accepted on the understanding that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. All submitted articles will be scrutinised for possible overlap and duplication with already published work. Papers may be subject to editorial revision without notice and remain the copyright of the journal. If a paper that has been returned to authors for revision is not received back in the editorial office after 90 days, it will be treated as a new submission. The Editors reserve the right to make the final decision whether or not a paper is accepted.

The author who submits a paper for publication is responsible that all other authors agree to its submission. All manuscripts must be accompanied by a covering letter signed by all authors. Persons named in the acknowledgements, and those responsible for any personal communications, must have agreed formally to their names so appearing.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. See the Online Open section below for more information.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Manuscripts

Manuscripts must be saved for submission in double spaced format. If submitted as hardcopy they should be printed on one side of the paper only.

The date of submission used will be the date of submission of the electronic text version, or on receipt of the hard copy text plus illustrations, as applicable. Authors are advised to keep a copy of all manuscripts, as no responsibility can be accepted for loss.

The text should follow the following format:

Front page:

A single 'front page' must give: (1) the title of the manuscript; (2) a short running title (not exceeding 40 characters); (3) the name(s) of the author(s) including forename and surname; (4) the department(s) in which the work was done; and (5) the name, full postal address, fax number and e-mail address of the author to whom the proofs and requests for offprints should be sent, to be headed 'Correspondence'. The Corresponding Author should take responsibility for communicating with all other authors and getting their approval for the final version to be published. During online submission corresponding authors can nominate an individual, who may or may not be an author, to assist them with administration of the publication process.

You should confirm that all listed authors meet ICMJE authorship criteria and that nobody who qualifies for authorship has been excluded. Credit for authorship should be based on: [1] substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data; [2] drafting the paper or revising it critically; [3] approval of the submitted and final versions. Authors should meet all three criteria.

Second page:

The second page should contain a summary paragraph which should give a factual account of the context in which the study has been performed, the objective(s), methods and results, and a brief conclusion, in not more than 250 words. For refereeing and indexing purposes, up to six 'keywords' related to subjects discussed in the paper should be identified and included at the foot of the summary.

Text

Reports of original work should usually be arranged in the conventional order of introduction, methods, results, discussion, acknowledgements and references, with suitable headings for each part. Further sub-divisions, with appropriately less significant headings, can be used. Results may be presented in the text, in tables and figures, but the text should, in general, comment on rather than repeat information in tables.

General

Papers must be written in clear, concise English. Spelling should follow The Concise Oxford Dictionary of Current English. Avoid jargon and neologisms. The journal is unable to undertake major corrections of language, which is the responsibility of the author. Where English is not the first language of the authors, the paper should be checked by a native English speaker. Authors may suggest the names of suitable referees in a covering letter, or via the website, if they so wish.

Reviews

Reviews will normally be commissioned. Authors wishing to submit unsolicited reviews are advised to consult the editor in advance, as they will not be considered unless this has been done. Once the editor has agreed to consider a review, the guidelines for submitting on line are the same as for original article.

Letters to the Editor

Correspondence which relates to papers which have recently appeared in the Journal may be published. The Editor reserves the right to invite a response from the original authors for publication alongside. Letters should be as short as possible (but no more than 1000 words of text, two figures or tables or one of each, and up to 10 references). Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Tables and Figures

For online submission, illustrations should be embedded in the Word document or uploaded as separate files. Quality should be sufficient for viewing on-screen and desktop printing.

Where possible, please provide high quality digital artwork files.

Both tables and figures should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each should have a separate descriptive legend. Keys should be given in the legends, not in the figure itself. All illustrations, both drawings and photographs, must be of good quality since delay will result if referees need to see improved versions. Digital versions of figures should be supplied in TIFF format. As a guide, the ideal figure resolution/specification for various types of original figures, at their final size, is as follows:

Line art and diagrams - Minimum 600 dpi

Halftone (both B/W and Colour photographs) - Minimum 300 dpi

Line and tone (line art and halftone combined) - Minimum 600 dpi

It is best to use Illustrator or Photoshop software and to save the material in the format '.eps' or '.tif'. If you are unable to provide these formats, please save the figures in as many different file formats as possible. In addition to any electronic files, always send three high-quality printed versions of the figures to the editorial office. For further information on file formats, please see the instructions on our website at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

Colour Illustrations

One colour illustration is published free of charge. Subsequent colour illustrations are charged to the author to cover the cost of reproduction. The charge for any subsequent colour illustrations is £50.00. If there is more than one colour illustration in your manuscript when it is accepted for publication, then Wiley-Blackwell require you to complete and return a hard copy colour work agreement form before the paper can be published. The form must be an original, signed, hard copy to be processed. This form can be downloaded as a PDF [here](#).

Please post the signed hard copy form to:

Valerie Oliveiro

Production Editor for IJEP

Journal Content Management

Scientific, Technical, Medical, and Scholarly

Wiley

1 Fusionopolis Walk

#07-01 Solaris South Tower

Singapore 138628

Email: ijep@wiley.com

In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, International Journal of Experimental Pathology offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office and indicate colour online only in the Colour Work Agreement Form. Note: Any article received by Wiley-Blackwell with more than one colour illustration will not be published until the form has been returned.

* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Measurements

Measurements should be expressed in SI units. If the original observations were recorded in other units, this should be stated, together with the appropriate conversion factors.

Standard Abbreviations

Standard abbreviations should be used and should follow those laid down in *Units, Symbols and Abbreviations* (1994) published by the Royal Society of Medicine. Abbreviations should be used sparingly and only if a lengthy name or expression is repeated frequently throughout the manuscript. Words must appear in full on first appearance in both summary and text, followed by the abbreviation in parentheses. Drugs should be described by their official names but trade names should be indicated in parentheses the first time the drug is quoted in the text.

References

We recommend the use of a tool such as Reference Mmanager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

References must be double spaced and should be made only to papers closely related to the author's work. Exhaustive lists should be avoided. In the text, use the name of the author(s) followed by the date of publication; where there are two authors use the form: Sorensen and Read 2002; where there are more than two authors use the form: Turton et al. 2002.

Arrange the list of authors quoted at the end of the text in alphabetical order set out as follows:

A) Name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), title of the article, name of the journal, volume number, first and last page numbers. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. (Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1997;336: 309-315.)

B) In the case of books the order is: name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), chapter title, full book title, edition, names of the editors, place and name of publisher, and page numbers.

C) References to 'personal communications' and 'unpublished work' may be quoted in the text with all names and initials to avoid confusion but should not be included in the references.

Examples of the style to be used are given below:

Turton J.A., Andrews C.M., Havard A.C. & Williams T.C. (2002) Studies on the haemotoxicity of chloramphenicol succinate in the Dunkin Hartley guinea pig. *Int. J. Exp. Path.* 83, 225-238.

Katz D.R., & Pollara G. (2003) Surviving the immune response: an immunologist's perspective. In *Dormancy and Low Growth States in Microbial Diseases*. Ed A. Coates. Cambridge University Press pp 75-100.

Permissions

Materials copied from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher giving permission to the International Journal of Experimental Pathology for reproduction. Authors are responsible for obtaining permission in writing from at least one author of papers cited while still in press, as well as of unpublished data and of personal communications. It is the author's responsibility to ensure that permissions are obtained.

Author Material Archive Policy

Unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Production Editor as soon as possible if you have not yet done so.

Page Proofs

Proofs will be sent electronically via e-mail as an Acrobat PDF file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html

This will enable the file to be opened, read and corrected on screen. Further instructions will be sent at the same time as the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Early View

The International Journal of Experimental Pathology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have

been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Citing online articles The Journal encourages citation of online articles before they are published in final form when they become available in PubMed or from journal/publisher websites, e.g. Early View articles from the International Journal of Andrology website. The citation must take the following form:

Author(s), Title, Journal, Year; in press (DOI).

Any article that lacks a year of publication or a DOI will not be considered a valid reference citation and cannot be cited.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit authorservices.wiley.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Note to NIH Grantees Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 6 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Por ISSN do Periódico

Por Título do Periódico

Por Classificação / Área de Avaliação

Lista Completa

 Título:

| ISSN | Título | Estrato | Área de Avaliação | Classificação |
|-----------|---|---------|-------------------------|---------------|
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | A2 | ODONTOLOGIA | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | B1 | MEDICINA II | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | B2 | EDUCAÇÃO FÍSICA | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | B1 | MEDICINA I | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | B1 | FARMÁCIA | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | B2 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | B1 | BIODIVERSIDADE | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | B1 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | A2 | MEDICINA VETERINÁRIA | Atualizado |
| 0959-9673 | International Journal of Experimental Pathology (Print) | A1 | CIÊNCIAS AGRÁRIAS I | Atualizado |

« « 1 2 3 » »

**Atigo 2: Exercício Físico Moderado Protege Neurônios Mientéricos
Metabolicamente Mais Ativos em Camundongos Infectados por
*Trypanosoma cruzi***

Resumo

Introdução e objetivo Devido à grande quantidade de pessoas infectadas por *T. cruzi* e ausência de cura, este trabalho avaliou a influência do exercício físico moderado sobre neurônios NADH-diaforase positivos (NADH-d) do plexo mientérico e parede intestinal do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi*, considerando aspectos parasitológicos e imunológicos.

Materiais e métodos Quarenta camundongos suíços machos com 30 dias, distribuídos em: Treinado Infectado-TI; Sedentário Infectado-SI; Treinado Controle-TC e Sedentário Controle-SC. Os grupos TC e TI foram submetidos a programa de exercício físico moderado em esteira rolante, durante oito semanas. Três dias após o término do exercício físico TI e SI foram inoculados (1300 tripomastigotas sanguíneas *T. cruzi*-cepa Y, i.p.). A parasitemia foi avaliada do 4º.-61º. DI. Aos 75 DI foram quantificados/medidos neurônios mientéricos do cólon (NADH-d), contados focos inflamatórios, dosados TNF- α e TGF- β no plasma. Os resultados foram comparados com ANOVA-Tukey, Kruskal-Wallis, 5% de significância.

Resultados O exercício físico moderado reduziu o pico de parasitos no 8º dia de infecção ($p=0,0132$) e a parasitemia total ($p=0,0307$). Impediu a despopulação neuronal ($p<0,01$), provocou hipertrofia destas células ($p<0,05$), prevenindo a formação de focos inflamatórios ($p<0,01$) e proporcionou aumento ($p<0,01$) na síntese de TNF- α e TGF- β ($p>0,05$).

Conclusão O exercício físico moderado promove benefícios na infecção experimental por *T. cruzi*, diminuindo a parasitemia, preservando neurônios mioentéricos e prevenindo inflamação.

Palavras-chave: Treinamento físico, *Trypanosoma cruzi*, cólon, plexo mientérico, TNF- α , TGF- β .

Introdução

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas atinge cerca de 10 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica com mais de 25 milhões expostas ao risco de infecção [1]. No Brasil aproximadamente três milhões de pessoas estão infectadas [2]. *T. cruzi* ao infectar o hospedeiro provoca desenvolvimento de processo inflamatório [3] e ativação do sistema imunitário. Contudo, ele não é detido e invade aleatoriamente diversos órgãos, entre eles, coração, intestinos/esôfago e sistema nervoso central [3]. No tubo digestório ocorre destruição de neurônios do Sistema Nervoso Entérico – SNE [4, 5], com neurônios inibitórios e excitatórios [6]. Dentre estas populações verificam-se neurônios metabolicamente mais ativos [7], capazes de manter a homeostase das contrações e relaxamento muscular intestinal [8]. Após a destruição destes neurônios, ocorre diminuição da coordenação muscular e alterações do movimento peristáltico [3]. Indivíduos com estas alterações apresentam retenção do bolo alimentar e/ou fecal com consequente dilatação do órgão [9]. Dessa forma, estudos sobre neurônios metabolicamente mais ativos do plexo mientérico de animais infectados por *T. cruzi* são necessários.

Os medicamentos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são o benznidazol e nifurtimox. Além de ambos poderem causar graves efeitos adversos, são de baixa eficácia na fase crônica da doença [10]. Mesmo pacientes tratados podem apresentar sintomas de constipação e complicações intestinais graves [11]. Assim, a busca de tratamento alternativo/complementar tem sido um grande desafio [12].

A infecção por *T. cruzi* promove destruição significativa de neurônios mientéricos [4,5]. O exercício físico moderado representa um fator de resistência contra o desenvolvimento da infecção causada por *T. cruzi* em animais [13-15], modulando a resposta imunológica e

neuroimunoendócrina [14, 16,17]. Pesquisas realizadas com animais, onde é possível controlar a carga de exercício físico e a presença de agente infeccioso, mostram os benefícios desta prática [13-15]. Especificamente, o exercício físico moderado promove proteção eficaz da população neuronal total em camundongos infectados por *T. cruzi* [18]. Comparando-se camundongos sadios sedentários e treinados a prática do exercício físico moderado mostra efeito protetor para neurônios metabolicamente mais ativos e neurônios nitrérgicos [19]. No entanto, não estão disponíveis relatos de alterações produzidas em neurônios metabolicamente mais ativos do plexo mientérico do cólon de camundongos submetidos ao exercício físico moderado e infectados por *T. cruzi*.

Sendo assim, este trabalho avaliou a influência do exercício físico moderado sobre neurônios NADH-diaforase positivos (NADH-d) do plexo mientérico e da parede do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi* considerando ainda o impacto relacionado a aspectos parasitológicos, imunológicos e patológicos.

Materiais e Métodos

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação (CEAE), da Universidade Estadual de Maringá-Brasil (Parecer 046/2009).

Animais

O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio e repetido duas vezes. Foram utilizados em cada repetição 40 camundongos suíços machos, 30 dias de idade, distribuídos em: Treinados (n=20) e Sedentários (n=20).

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, forradas com maravalha, limpas duas vezes na semana e permanecendo em biotério climatizado (temperatura entre 21 e

23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas com água (clorada) e ração (Nuvilab Cr-1[®] da Nuvital[®]) disponíveis *ad libitum*.

Protocolo de exercício físico moderado

Os animais com 30 dias de vida foram submetidos ao programa de exercício físico aeróbio moderado em esteira rolante (*Inbrasport*[®] modelo *Classic CI*[®]), durante oito semanas, composto por uma sessão diária de treinamento, cinco vezes na semana, com duração de 30 a 45 minutos com velocidade de seis a 14 m/min na primeira semana, 45 a 60 minutos e velocidade de oito a 16 m/min na segunda semana e 60 minutos com velocidade de 10 a 20 m/min nas demais (velocidade média de 13 m/min nas quatro primeiras semanas e 17,5 m/min nas quatro últimas), com início a partir das 18h00m (ciclo escuro - respeitando o hábito noturno dos animais). Este protocolo corresponde a um esforço moderado [14, 20]. Não foram utilizados mecanismos de choque ou similares para induzir o animal a se exercitar.

Infecção

Após o término do programa de treinamento físico, os animais foram redistribuídos em: Treinado Controle (TC) (n=10); Treinado Infectado (TI) (n=10); Sedentário Controle (SC) (n=10) e Sedentário Infectado (SI) (n=10).

Foram inoculados 1300 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, (via i.p.). Os grupos TI e SI foram inoculados três dias após o término do programa. A fase crônica foi obtida com três doses de BENZNIDAZOL (LAFEPE-PE/Brasil), (100mg/Kg/m.c.) aos 11, 15 e 22 dias após a inoculação-dpi e duas doses (250mg/Kg/m.c.), aos 18 e 41 dpi, via oral-gavagem.

Avaliação da evolução da infecção

A parasitemia foi avaliada em todos os animais infectados, utilizando a técnica de [21]. A contagem de parasitos foi realizada do 4º ao 15º dias após a inoculação (dpi) e em dias alternados do 15º ao 61º dpi. A curva foi traçada utilizando a parasitemia média dos animais.

A partir da análise da curva de parasitemia foram determinados os períodos pré-patente e patente, pico de parasitos e parasitemia total. Foi calculada a porcentagem de mortalidade dos animais e semanalmente a massa corporal (gramas).

Eutanásia e coleta de órgãos

Aos 75 dpi, os animais foram eutanasiados. O cólon de cinco de cada grupo foi submetido à técnica histoquímica da NADH-d segundo [7]. A área do cólon expressa em cm^2 foi calculada medindo largura e comprimento do material coletado.

Análise quantitativa de neurônios mientéricos NADH-d

Foram quantificados os neurônios presentes em 120 campos microscópicos $45,6\text{mm}^2$ fotônico (Olympus CBA), com objetiva de 40X distribuídos por toda a circunferência intestinal. A desnervação foi avaliada pela comparação entre grupo teste e controle, sendo expressa em porcentagem.

Análise morfométrica de neurônios mientéricos NADH-d

Foi mensurada a área (μm^2) do corpo celular e do núcleo de 300 neurônios do plexo mientérico distribuídos por toda a circunferência intestinal/cada animal. As imagens foram capturadas em microscópio fotônico trinocular (MOTIC B5) acoplado a uma câmera de vídeo digital de alta definição (MOTICAM 2000). As medidas foram realizadas utilizando software Image-Pro Plus.

Análise histológica e quantitativa de focos inflamatórios na parede intestinal

Foram utilizados 5 animais por grupo e obtidos de cada três cortes transversais com $4\ \mu\text{m}$ de espessura, para quantificar os focos inflamatórios e o número de células inflamatórias em 10 campos microscópicos com $1,9\ \text{mm}^2$ de diâmetro distribuídos em toda circunferência

intestinal, na túnica muscular de três cortes histológicos de cada animal para obtenção da média. Foram considerados focos inflamatórios aqueles com 10 ou mais células inflamatórias [22]. Foi utilizada a coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Foi utilizado microscópio fotônico (Olympus CBA), com objetiva de 40X.

Dosagem de citocinas

Foram dosadas Interleucina-10 (IL-10), Interferon- γ (IFN- γ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Fator de crescimento transformador- β (TGF- β). Foi utilizado o plasma de dez animais por grupo e a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) de captura, com pares de anticorpos da R&D system Inc[®] (Minneapolis-USA). A técnica foi desenvolvida de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A concentração das citocinas foi determinada com referência à curva padrão obtida com citocina murina recombinante. Os resultados foram expressos em pg/mL para IL-10, IFN- γ e TNF- α e em ng/mL para TGF- β .

Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada com o teste D'Agostino Pearson e/ou Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal foram expressos como média \pm desvio-padrão e comparados com o teste ANOVA-Tukey. Dados com distribuição não especificada foram expressos como mediana e percentis 25 e 75 (P25 e P75) e comparados com o teste Kruskal-Wallis e teste das Medianas. Foi utilizado nível de significância de 5% e o programa BioEstat 5.0[®]. Foi realizada estatística de efeito site (<http://www.uccs.edu/~lbecker/>), utilizando-se o teste *Effect size calculators*, verificando-se a intensidade do efeito do exercício físico em relação ao sedentarismo sobre a infecção murina por *T. cruzi*. O efeito foi considerado pequeno quando

observado resultado $\leq 0,2$. Médio quando é observado efeito $> 0,2$ a $\leq 0,5$ e grande quando é observado efeito $> 0,5$.

Resultados

Evolução da infecção

O pico de parasitos no 8º dia de infecção e a parasitemia total foram 48,1% ($p=0,0077$) e 72,3% ($p=0,0065$) menores nos animais do grupo TI que o observado em animais do grupo SI. Não houve diferença estatística entre os grupos para infectividade, período pré-patente e período patente assim como para a mortalidade (Fig. 1 e Tabela 1) ($p>0,05$).

Durante a infecção a massa corporal dos animais manteve-se estável para TI e SI ($p=0,6914$). Não houve alterações significantes no comprimento, diâmetro e área total do cólon dos camundongos avaliados ($p>0,05$).

Análise quantitativa de neurônios mientéricos NADH-d

O treinamento protegeu os neurônios NADH-d em 15,2%. Este dado é resultante da subtração do percentual da comparação de animais treinados (TC x TI = 22,4% - $p<0,01$) menos o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 37,6% - $p<0,01$) (Tabela 2 e Fig. 2).

Ao projetar o número de neurônios para a área total do cólon observou-se que o exercício físico impediu significativamente a morte de neurônios NADH-d em 26,0%. Número resultante da subtração do percentual da comparação de animais treinados (TI x TC = 11,5% - $p<0,01$) menos o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 37,5% - $p<0,01$) (Tabela 2 e Fig. 2). A proteção neuronal obtida foi confirmada pela estatística de efeito verificando-se “grande efeito” de 9,1 para a comparação (TI x SI).

Análise morfométrica de neurônios mientéricos NADH-d

O exercício físico e/ou a infecção nos animais do grupo TI provocaram hipertrofia em neurônios NADH-d, quando comparados aos neurônios de animais sedentários infectados SI. O resultado da subtração entre os valores (área nuclear TC x TI = 7,1% – SC x SI = 11,4%), (área citoplasmática TC x TI = 6,8% – SC x SI = 15,5%) e (corpo neuronal TC x TI = 24,8% – SC x SI = 3,0%) comprova o aumento e indica o benefício do treinamento sobre neurônios NADH-d em animais infectados que foi de (4,3% - área nuclear), (8,7% - área citoplasmática) e (21,8% - corpo neuronal) que significa “pequeno efeito” de 0,02 para a comparação TI x SI. (Tabela 3).

Proporção de focos inflamatórios e dosagem de citocinas

O número de focos inflamatórios na túnica muscular intestinal dos animais TI foi 64,5% menor que nos animais SI ($p < 0,01$) sendo que o exercício físico foi responsável pela prevenção de 72,2% ($(TI-TC \times 100 \text{ dividido por } SI-SC)$) na formação do número de focos inflamatórios (Tabela 4), confirmado pela estatística de efeito, verificando-se “grande efeito” de 1,8 para a comparação TI x SI.

O exercício físico proporcionou aumento significativo da síntese de TNF- α de 18,0% ($p < 0,01$). Este dado é resultante da variação entre o percentual de comparação de animais treinados (TC x TI = 23,4% - $p < 0,01$) e o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 41,3% - $p < 0,01$), confirmado pela estatística de efeito onde foi verificado “grande efeito” de 1,3 para a comparação (TI x SI) (Tabela 4).

O exercício físico proporcionou aumento não significativo da síntese de TGF- β em 18,0%. Este dado é resultante da variação entre o percentual da comparação de animais treinados (TC x TI = 21,4% - $p < 0,01$) e o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 39,0% - $p < 0,01$), com “grande efeito” de 0,7 para esta comparação (Tabela 4). Não foram observados níveis detectáveis para IFN- γ e IL-10, nas condições experimentais avaliadas.

Discussão

Este é o primeiro estudo realizado para verificar a influência do exercício físico moderado sobre neurônios metabolicamente mais ativos e da parede do cólon de camundongos infectados por *T. cruzi* considerando ainda o impacto relacionado a aspectos parasitológicos, imunológicos e patológicos.

Os dados parasitológicos mostraram que o exercício físico moderado modulou o desenvolvimento da infecção de forma diferente do observado em animais sedentários. O pico de parasitos e a parasitemia total foram significativamente menores no grupo TI que o observado no grupo SI. Estes resultados estão de acordo com Schebeleski-Soares et al. e Occhi et al. [14, 16], que observaram redução significativa no pico de parasitos em camundongos de duas linhagens distintas de ambos os sexos submetidos a exercício físico moderado pré-infecção com a cepa Y de *T. cruzi*.

No presente estudo não foi observado diferença significativa na massa corporal dos animais entre os grupos TI e SI ($p > 0,05$) durante a evolução da infecção. Esta homeostase provavelmente deveu-se a uma resposta positiva dos animais advinda da modulação do sistema imune pelo exercício físico moderado e ao tratamento descontínuo com o benznidazol para cronificação da infecção. Este fármaco, embora não apresente completa eficácia de cura, impede a evolução da parasitemia que é, em última análise, uma das causas de morbidade da infecção por *T. cruzi* [10].

A modulação da evolução da infecção pelo exercício físico moderado conferiu proteção ao grupo de neurônios metabolicamente mais ativos tanto na área amostral estudada (15,2%), quanto para a projeção do número de neurônios na área total do cólon (26,0%). Ambos os dados resultaram em “grande efeito” do exercício para proteção de neurônios NADH-d. A

técnica histoquímica da NADH-d marca neurônios metabolicamente mais ativos por meio da ativação da enzima NADH-d, localizada na matriz mitocondrial [7, 23], no entanto, não permite diferenciar neurônios inibitórios de excitatórios, responsáveis pelos reflexos de dilatação e contração da parede intestinal [6, 8]. Os resultados obtidos evidenciam os benefícios do exercício físico moderado para a preservação dessas classes neuronais e reforçam a importância da inserção de um programa de atividade física moderada com perspectivas reais de melhoria de atendimento a indivíduos infectados por *T. cruzi* num contexto de saúde pública.

Nos animais sedentários controles e infectados, observou-se decréscimo significativo do número de neurônios NADH-d (SI x SC). Da mesma forma, Maifrino et al. [24] evidenciaram decréscimo da população NADH-d mientérica no cólon proximal de camundongos infectados com *T. cruzi*, em relação ao seu controle. No presente estudo a redução não se relacionou à alterações morfométricas da área do cólon dos animais infectados, visto que o comprimento e o diâmetro do órgão mantiveram-se inalterados.

Os animais do grupo TC, apresentaram percentual neuronal significativamente maior que os demais grupos. Os dados neuronais obtidos nos grupos TC e SC estão de acordo com os encontrados por Clebis [25] que ao trabalhar com ratos observou aumento do número de neurônios NADH-d, do jejuno de ratos treinados (corrida em esteira) em relação aos sedentários (12 meses de idade). Gagliardo [26] ao avaliar os neurônios NADH-d das porções ascendente e descendente do cólon de ratos Wistar, sedentários (seis e 12 meses de idade) e submetidos a um programa de atividade física (corrida em esteira) 12 meses, observou que o número de neurônios estava ligeiramente aumentado nos animais que praticaram atividade física em relação aos sedentários.

Os dados morfométricos mostraram que neurônios NADH-d sobreviventes nos animais do grupo TI apresentaram hipertrofia com aumento da área nuclear e citoplasmática em relação

aos animais do grupo SI ($p > 0,05$), confirmada pela estatística de efeito com “pequeno efeito” de 0,02. O aumento da área nuclear e citoplasmática apresentado em neurônios NADH-d mientéricos pelo exercício físico moderado parece ser benéfico, sugerindo aumento da síntese de proteínas envolvidas no controle da contração e relaxamento da parede intestinal, indicando que a prática do exercício físico moderado faz-se necessária.

Quanto ao processo inflamatório na túnica muscular, observou-se redução significativa no número de focos inflamatórios em animais do grupo TI em relação aos animais SI, sendo que o exercício físico moderado foi responsável pela prevenção na formação de focos inflamatórios mostrando “grande efeito” de 1,8. Este resultado certamente está relacionado ao menor número de parasitos observado em animais treinados. De acordo com Silveira [27], a grande maioria das células inflamatórias presentes nas camadas musculares do colo de pacientes chagásicos, portadores e não portadores de megacolo são leucócitos mononucleares, os quais possuem potencial citotóxico. Estes leucócitos quando ativados por *T. cruzi*, liberam uma substância tóxica levando a destruição das células dispostas nas camadas musculares. O trabalho de Silveira [27] proporciona embasamento para hipotetizar a participação das células inflamatórias no processo de desnervação neuronal, induzido pela infecção causada por *T. cruzi*. Os dados aqui obtidos sustentam a hipótese levantada Silveira [27], visto que o número de focos inflamatórios presentes nos animais do grupo SI estava significativamente aumentado em relação ao grupo SC, com “grande efeito” da infecção de 2,7, conferindo redução do número significante do número de neurônios NADH-d (SI x SC).

É importante destacar que a redução do número de foco inflamatório no grupo TI é observado concomitante ao aumento da síntese de citocinas, visto que os animais deste grupo (TI) produziram significativamente mais TNF- α que os animais do grupo SI. Da mesma forma, O exercício físico moderado proporcionou aumento significativo da síntese de TNF- α quando comparados animais treinados com sedentários. Aumento este confirmado pela estatística de

efeito (“grande efeito” de 1,3). O aumento significativo da síntese de TNF- α justifica a redução na curva de parasitemia, inibição da formação de foco inflamatório e proteção de neurônios NADH-d.

Segundo a literatura, concentrações elevadas de TNF- α induzem a caquexia, sendo esta citocina um importante preditor de perda de massa corporal [28]. Contudo, o TGF- β e IL-10 são citocinas com capacidade de manter a homeostasia da resposta imune do hospedeiro, particularmente as que envolvem macrófagos [29]. No presente estudo embora não significativo os animais treinados e infectados (TI) apresentaram aumento da síntese de TGF- β mostrando “grande efeito” de 0,7 para a comparação (TI x SI), enfatizando a importância da prática do exercício físico moderado para a regulação imune e controle da ativação de macrófagos em resposta às alterações fisiológicas decorrentes da infecção por *T. cruzi* no hospedeiro. Estudos realizados em fragmentos do miocárdio de pacientes humanos com cardiopatia chagásica crônica e insuficiência cardíaca congestiva, após irem a óbito, mostraram que o TGF- β estava pouco expresso, sugerindo algum fator inibitório atuando sobre macrófagos, podendo corresponder à imunodepressão devido à presença de *T. cruzi* [30].

Em conclusão, o exercício físico moderado limita o desenvolvimento da infecção diminuindo parasitemia na fase aguda de camundongos inoculados com *T. cruzi*, protege a população de neurônios metabolicamente mais ativos e induz a hipertrofia de neurônios, significando melhor prognóstico para o animal cronicamente infectado com relação à manutenção do peristaltismo intestinal. Além disso, provoca redução do número de focos inflamatórios e aumento da síntese de TNF- α e TGF- β . Estes resultados aprofundam a fundamentação já consistente dos benefícios do exercício físico moderado e levam a perspectivas reais de melhoria de atendimento a indivíduos infectados cronicamente por *T. cruzi*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) e *Fundação Araucária* do Paraná, pelo apoio financeiro.

FIGURAS E TABELAS

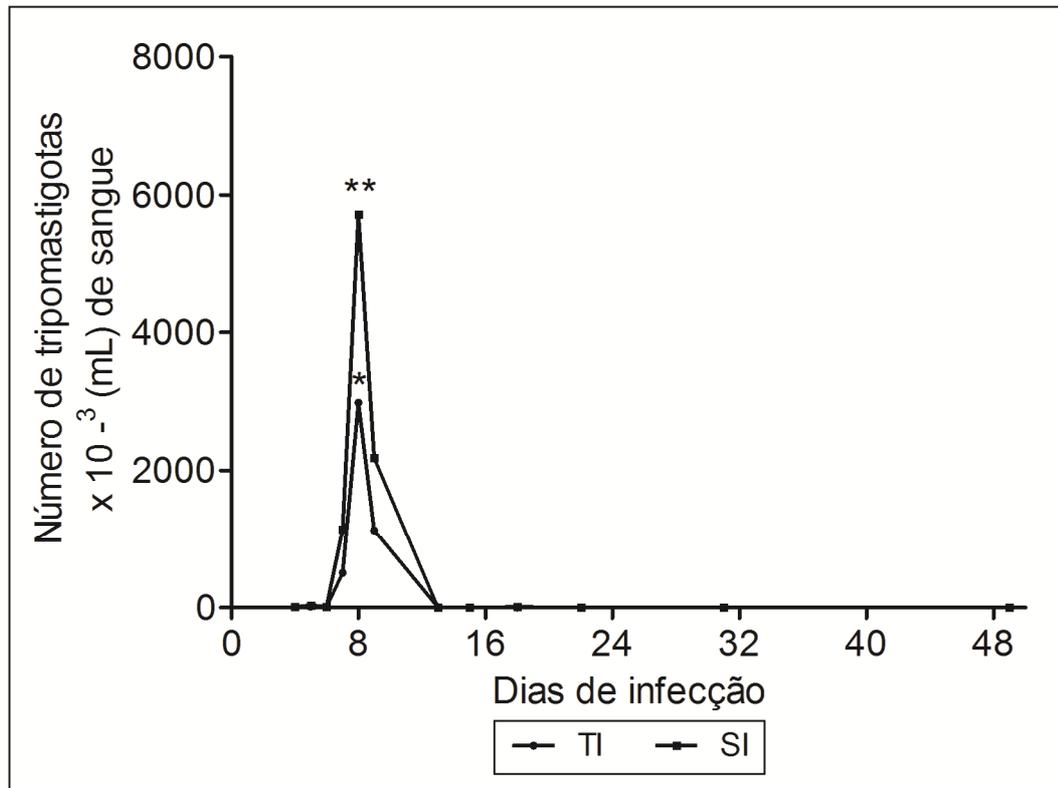


Fig. 1 Curva de parasitemia média de camundongos suíços, após 12 semanas de idade, submetidos ao exercício físico e posteriormente infectados (TI) ou mantidos sedentários e posteriormente infectados (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias. Comparação entre TI e SI no oitavo dia após a infecção. ($p = 0,0077$). Teste: Mann-Whitney.

Tabela 1 Parâmetros parasitológicos avaliados em camundongos, suíços, machos, após 12 semanas de idade submetidos ao exercício físico e posteriormente infectados (TI) e mantidos sedentários e posteriormente infectados (SI) com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| Grupo | Infectividade (%) | Período Pré-Patente (dias) | Período Patente (dias) | Pico de Parasitos (tripomastigotas/mL X 10 ⁶) | Parasitemia Total (tripomastigotas/mL X 10 ⁶) |
|-------------|-------------------|----------------------------|------------------------|---|---|
| TI (n = 10) | 100 | 5,31 ± 1,44 | 7,00 ± 4,21 | 2,98 ± 1,14 | 4,65 ± 1,60 |
| SI (n = 10) | 100 | 4,42 ± 0,51 | 5,58 ± 0,51 | 5,71 ^a ± 3,32 | 16,83 ^b ± 28,27 |

(n = número de animais) Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Comparações entre TI e SI. (a: p = 0,0077; b: p = 0,0065). Teste: Mann-Whitney.

Tabela 2 Densidade neuronal mientérica* do cólon de camundongos, suíços machos, com 22 semanas de idade, Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| | Grupo | | | |
|--|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | TC (n = 5) | TI (n = 5) | SC (n = 5) | SI (n = 5) |
| Densidade neuronal em 45,6 mm ² | 9.849,3 ^a ± 756.88 | 7.635,2 ^b ± 830.8 | 6.731,4 ^b ± 579.9 | 4.195,6 ^c ± 761.8 |
| Projeção do número de neurônios para a área do cólon X 10 ⁷ | 62,2 ^a ± 45,0 | 55,0 ^b ± 3,2 | 39,7 ^c ± 7,4 | 24,8 ^d ± 3,4 |

*Em 240 campos microscópicos com 45,6 mm² de diâmetro. (n = número de animais). Dados apresentados como média ± desvio-padrão seguidos de letras diferentes numa mesma linha apresentam diferença significativa (p<0,01). Teste: ANOVA-Tukey.

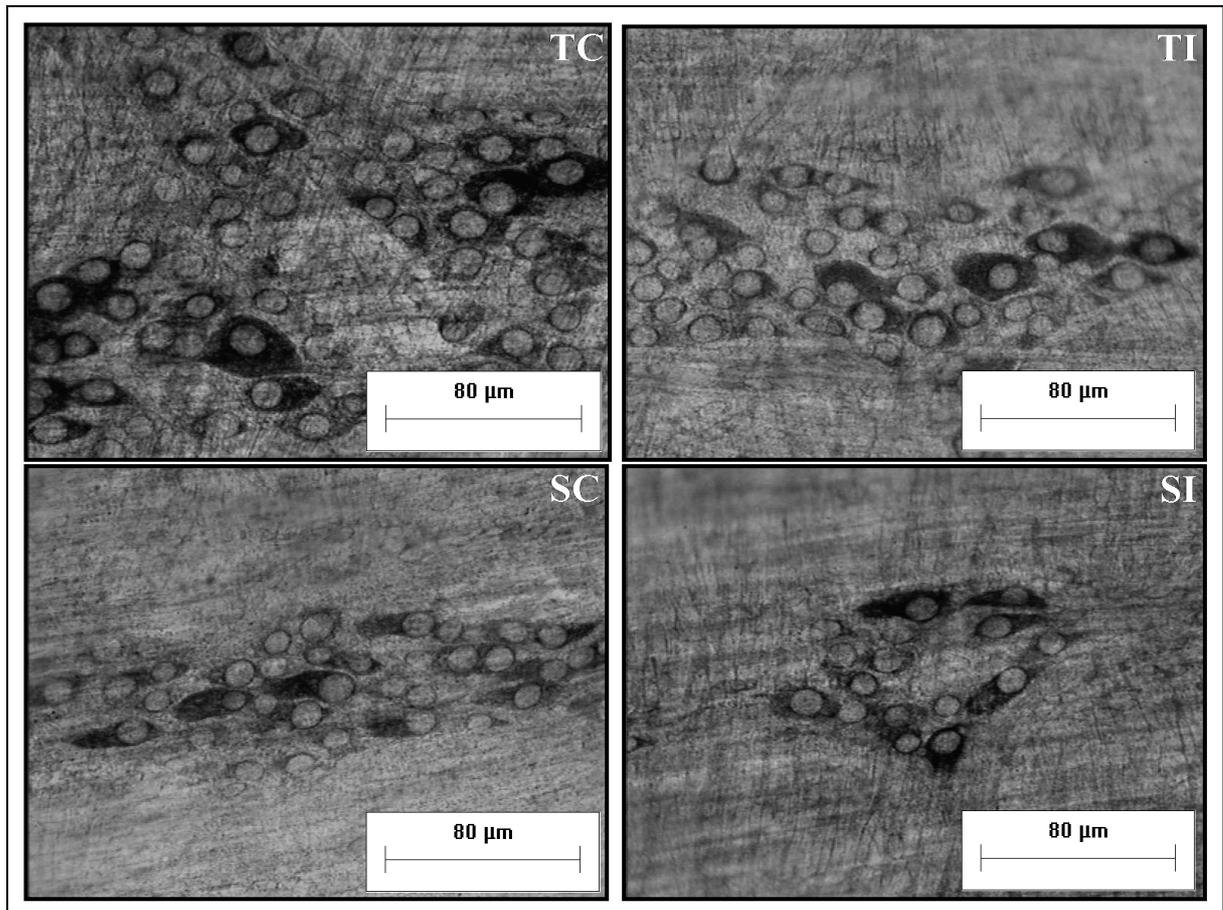


Fig. 2 Microfotografia mostrando gânglio mientérico no cólon de camundongos, suíços, machos, com 22 semanas de idade, marcados com NADH-d. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias. Microscópio fotônico (Olympus BX50), 200 X. Teste: ANOVA-Tukey.

Tabela 3 Morfometria de neurônios mientéricos do cólon de camundongos suíços, machos, com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, durante 75 dias.

| Parâmetro | Grupo | | | |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | TC (n = 5) | TI (n = 5) | SC (n = 5) | SI (n = 5) |
| Área do Núcleo (μm^2) | 70,0 ^a (55,1; 92,0) | 75,0 ^a (57,0; 92,0) | 66,4 ^b (54,3; 87,2) | 74,0 ^{ca} (56,1; 93,0) |
| Área do Citoplasma (μm^2) | 102,0 ^a (72,1; 154,0) | 96,0 ^b (66,4; 132,3) | 101,0 ^{cb} (65,0; 140,0) | 86,0 ^{db} (61,2; 147,0) |
| Área do Corpo celular (μm^2) | 180,0 ^a (133,0; 237,0) | 173,0 ^b (127,0; 221,0) | 165,1 ^b (135,3; 225,4) | 160,0 ^b (123,2; 245,0) |

(n = número de animais). Valores apresentados como mediana percentil (25; 75) seguidos de letras diferentes numa mesma linha apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Teste: Kruskal-Wallis.

Tabela 4 Média e desvio-padrão de focos inflamatórios na túnica muscular e concentração de TNF- α e TGF- β de camundongos suíços, machos, com 22 semanas de idade. Treinados Controles (TC), Treinados infectados (TI), Sedentários Controles (SC) e Sedentários Infectados (SI). Infecção com 1300 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* durante 75 dias.

| | Grupo | | | |
|--|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | TC (n = 5) | TI (n = 5) | SC (n = 5) | SI (n = 5) |
| No. de focos inflamatórios | 0,8 ^a \pm 0,8 | 2,8 ^a \pm 1,4 | 0,7 ^a \pm 0,9 | 7,9 ^b \pm 3,6 |
| TNF- α X 10 ⁻³ (pg/mL) | 10,7 \pm 5,1 | 13,2 ^a \pm 8,8 | 7,7 \pm 4,6 | 4,5 ^b \pm 3,3 |
| TGF- β (ng/mL) | 22,4 \pm 10,8 | 17,6 \pm 10,2 | 18,9 \pm 9,3 | 11,6 \pm 6,0 |

(n = número de animais). Dados seguidos de letras diferentes numa mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: Moreira et al. [31]. Teste: ANOVA-Tukey.

Referência

1. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 08-01-2013.
2. Portal da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454. Acessado em: 08-01-2013.
3. Lana M and Tafure WL. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas In: Neves DP, De Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana*. 12^a. ed. São Paulo: Atheneu; 2011: c.11,89-114.
4. Adad SJ, Cançado CG, Etchebehere RM, et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch*. 2001; 438:254–258.
5. Silveira AB, Freitas MA, de Oliveira EC, et al. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology*. 2008;135:1337-1342.
6. Furness JB and Costa M. *The enteric nervous system*: Churchill livinestone. New York; 2006.
7. Gabella G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experientia*. 1969;23:218-219.

8. Furness J. *Types of nervous system*. *J Auton Nerv Syst*: 2000;87-96.
9. Leão EP, Pena CJ, Araújo SM, Gomes ML. Physical therapy combined with a laxative fruit drink for treatment of chagasic megacolon. *Arq Gastroenterol*. 2011;48:52-53.
10. Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas' disease living in Santa Fé City (Argentina), over a mean follow-up of 21 yers: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:1-10.
11. Santos Júnior JCM. Megacólon-Parte II: Doença de Chagas. *Ver Brás Coloproctol*. 2002;4:266-277.
12. Pupulin AR, Marques-Araujo S, Toledo MJ, et al. Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2010;126:435-440.
13. Silva EA. *Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mientérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses*. 2006. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2006. Universidade de São Paulo, São Paulo.
14. Schebeleski-Soares C, Occhi-Soares RC, Franzói-de-Moraes SM, et al. Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009;34:659-665.

15. Soares CS, Occhi RC, Carvalho LGL, Moraes SMF, Dalálio MMO, Araújo SM. Produção de fator de necrose tumoral-alfa e peróxido de hidrogénio na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos ao exercício. *Acta Scientiarum. Health Scinces*. 2010;32:57-60.
16. Occhi RC. Soares CS, Franzói-De-Moraes SM, et al. Infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. *Ver. Brás. Méd. Esp*. 2012;18:51-57.
17. Malm C. Exercise Immunology: the Current State of Man and Mouse. *Sports Med*. 2004;34:555-566.
18. Nagatomi R. The Implication of Alterations in Leukocyte Subset Counts on Immune Function. *Rev Exerc Immunol*. 2006;12:54-71.
19. Rosa LFBPC and Júnior MLB. Efeito do treinamento físico modulador positivo nas alterações no eixo neuroimunoendócrino em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica: possível atuação do fator de necrose tumoral- α . *Rev Brás Med Esporte*. 2005;11:238-242.
20. Lerman I, Harrison BC, Freeman K, et al. Genetic Variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J. Appl. Physiol*. 2002;92:2245-2255.

21. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*. 1962;4:389-396.
22. Oliveira GM, Diniz RL, Batista W, et al. Faz ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2007;171:79-86.
23. Miranda Neto MH, Molinari SL, Natali MR, Sant'Ana DM. Regional differences in the number type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;1:54-59.
24. Maifrino LBM, Amaral SON, Watanabe I, Liberti EA, De Souza RR. *Trypanosoma cruzi*: Preliminary investigation of NADH-positive and somastotatin-immunoreactive neurons in the myebteric plexus of the mouse colon during the infection. *Exp Parasitol*. 2005;111:224-29.
25. Clebis NK. *Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno em ratos Wistar*. 2006. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
26. Martinez Gagliardo K, Clebis NK, Stabille SR, De Britto Mari R, De Sousa JM, De Souza RR. Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. *Auton Neurosci* 2008;141:31-37.
27. Silveira ABM. *Estudo estrutural dos componentes do sistema nervoso entérico e de células inflamatórias: uma contribuição à imunopatologia do megacólon chagásico*. 2007. Belo Horizonte. Tese (Doutorado). 2007. Universidade Federal de Minas Gerais.

28. Anker SD and Coats AJS. A syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest*. 1999;115:836-47.
29. Abbas kA, Litchman AH and Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
30. Reis MM, Higuchi ML, Aiello VD, Benvenuti LA. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33:509-518.
31. Moreira NM, Santos FN, Toledo MJO, et al. Moderate physical exercise reduces parasitemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol*. 2013; No prelo.

ANEXOS

Instructions for Authors - Digestive Diseases and Sciences

Close

Digestive Diseases and Sciences

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

Digestive Diseases and Sciences publishes peer-reviewed basic and clinical studies and special articles on all aspects of gastroenterology and hepatology and related fields. The editors will consider and publish the following categories of manuscripts:

- Original Articles: basic or clinic research.
- Reviews (including systematic reviews and meta-analyses): basic or clinical topics.
- Special Category Articles: such as meeting reports (per approval of the editor-in-chief), comments on medical policy, or opinion pieces.
- Case Reports: in general, case reports are not encouraged; the editors will limit the number of case reports per issue and will only consider particularly novel and important clinical observations.
- Editorials: comment on papers published elsewhere in the issue and solicited by the editor-in-chief, and occasional special topics or announcements from the editors.
- Correspondence: concise opinions on papers published in Digestive Diseases and Science online within the past six months. In special circumstances, free-standing concise correspondence related to a unique clinical experience will be considered.
- Stanford Multidisciplinary Seminars: specifically allocated for the Stanford Multidisciplinary Seminars submitted by authors from Stanford and coordinated by the editor for this series.
- Industry Sponsored Articles and Reviews: provided that the relationship is clearly stated in the manuscript, editors will consider industry sponsored articles and reviews.
- DDS New Digestive Science: a forum for presenting exciting new basic science or clinical research findings that are important and novel, warranting early communication in brief. Findings presented in this format must be robust, innovative, and eventually important to medical practice.
- Medical Education and Practice: Scientific articles that focus on medical education or on common facets of medical practice.

Manuscripts should be concise, well organized, and clearly written. Acceptance of manuscripts will be based on originality and importance to the field of digestive diseases. Submitted manuscripts are reviewed by the editor-in-chief and associate editors and, in the majority of cases, by two or more experts in the field. The editors can choose to reject a manuscript without peer review if the manuscript is of insufficient quality or relevance to warrant acceptance. Manuscripts based on or those describing the experimental or therapeutic use of complex mixtures of chemically undefined substances such as plant-derived extracts will be returned without further review. The editors reserve the right to reject poorly written manuscripts even if their scientific content is potentially suitable for publication. Authors are responsible for the use of grammatically correct English. Springer reserves the right to copy edit accepted manuscripts. Proofs will be sent to the corresponding author for final approval, and must be returned within 48 hours of receipt.

ETHICS AND DISCLOSURE POLICIES

Material submitted to Digestive Diseases and Sciences (DDS) must be original and not published or submitted for publication elsewhere. Meeting abstracts do not constitute prior publication. Authors who have related material under consideration or in press elsewhere should upload a clearly marked copy at the time of their submission to DDS. If part of a contribution has appeared or will appear elsewhere in press, the author must specify the details in the covering letter accompanying the DDS submission. Duplicate publication (by the same author) and plagiarism (by a different author) must be avoided in accordance with “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” developed by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>). Each author must have participated substantially in the work and approve the final version of the manuscript. Where applicable, the following must be disclosed: all financial arrangements (research support, stock ownerships, equity interest, consultancies, or major honoraria) with a company whose product figures prominently in the manuscript; a statement of specific funding support; and identification of third party individuals who provided writing assistance. Reports of clinical trials with a control or comparison group should be presented according to the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org> or JAMA. 2001;285:1987-1991). The clinical trial registry URL (e.g., <http://www.clinicaltrials.gov> in the United States) and clinical trial number should be included in the body of the manuscript in the methods section.

<http://dds.edmgr.com>

INVESTIGATIONS INVOLVING HUMAN SUBJECTS

The journal requires that investigations performed on human subjects have the prior approval of the appropriate institutional or other independent ethics committee on human experimentation. This attestation should appear in the methods section of the manuscript. In countries where such mechanisms for approval do not exist, authors are required to indicate that the research was carried out in accordance with the Helsinki Declaration. A similar assurance is required to document that animal experimentation was performed under appropriate circumstances.

SUBMISSION

Manuscripts should be submitted online using Springer's manuscript submission and review system, Editorial Manager, at <http://dds.edmgr.com>. Editorial Manager supports a wide range of submission file formats:

- Manuscripts: Word, WordPerfect, RTF, TXT, and LaTeX
- Figures: TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript (Color art is FREE for both online and print publication!)

(Please note that PDF is not an acceptable file format for manuscripts or figures.)

Manuscript submission requires the uploading of at least one manuscript file (including references), but a cover letter, figures, figure legends, and tables may also be uploaded as separate files. Files should ideally be posted in the following order (order can be changed after uploading):

1. Cover letter
2. Manuscript
3. Tables
4. Figure legends (if separate)
5. Figures
6. Other

For all article types except correspondence and editorials, submission also requires the suggestion of four to six peer reviewers (experts in the topic area of the manuscript and not recent collaborators or from the same institution as the author[s]), including name, department, institution, and email address.

Once the manuscript is uploaded to Editorial Manager, the corresponding author will receive an email requesting approval of the PDF created from the source files. If not done immediately following upload, it is important to review and approve the PDF to initiate review by the editors.

Should any difficulties arise while submitting manuscripts online, please contact the responsible editorial assistant by clicking “Contact Us” in the Editorial Manager toolbar at the top of each page. Once submitted, a manuscript’s progress through the review process may be tracked in real time.

MANUSCRIPT STYLE

- Text should conform to accepted standards of American English style and usage. Before submitting an article to DDS, authors for whom English is a second language are encouraged to have their manuscripts reviewed and professionally edited by an individual whose native language is English.
- All manuscripts should be typed in 12-point font size and double-spaced with 1-inch margins. One space only should be used after periods and commas. Authors should retain a copy of all materials.
- The manuscript, if an original article, should be arranged as follows: Title Page, Abstract, Keywords, Introduction, Methods, Results, Discussion, References, Tables, Figure Legends, and Figures.
- The title page should include the title of the article, name(s) of author(s) and highest academic degree(s), department and institution from which the work originated, email and postal addresses of all authors, name of the corresponding author, acknowledgment of grant support, and disclosure of financial arrangements related to the research or assistance with manuscript preparation. Personal acknowledgments, if any, should be given in a separate section at the end of the article.
- Titles should state the main findings of the article, not focus on design of the research, and should not exceed 120 characters in length. Do not use abbreviations in titles.

- Authors of original articles should submit a structured abstract of no more than 250 words organized as applicable into the following categories: Background, Aims, Methods, Results, and Conclusions. Review articles should include a general abstract (i.e., the above categories are not required) also of no more than 250 words. Abbreviations, footnotes, and references should not be used in the abstract, with the exception of standard, repetitive abbreviations such as HCV, GERD, etc. Case reports should not include an abstract, though a short introduction as well as a brief discussion highlighting the key lessons from the case are both welcome.
- A list of four to six keywords should be provided directly below the abstract and for case reports, on the title page. Keywords should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes and should preferably be terms from the Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH) list.
- Editorials are invited by the editor and should be no longer than 1,500 words. Editorials should not have an abstract. The total number of references should be limited to a maximum of 10. Authors are encouraged to include a table or figure.
- Correspondence should be limited to 500 words and should relate to papers published in DDS within the past six months.
- Case reports should not exceed 600 words and should not include an abstract or more than ten references. Case reports should ideally include a short introduction and brief discussion, the latter highlighting key lessons from the case. There is no maximum word count or number of references (or figures) for case series including several cases or for all other manuscript types. (Case series can be submitted as article type Case Report or Original Article, depending in part on the number of cases being reported.)
- DDS New Digestive Science articles should be limited to 2,000 words, including an abstract of less than 250 words, and should include no more than a total of 3 tables and figures and fewer than 25 references. These submissions will be reviewed in standard fashion, but if accepted, the journal will ensure rapid online and expedited print publication.
- In the body of the manuscript, the ethical guidelines followed should be identified and the statistical methods employed should be outlined. When describing results, report P values and/or confidence intervals. Only standard abbreviations should be used and identified with first usage. Generic names of drugs should be used, although the brand name may be inserted in parentheses.

- Tables should be double-spaced on separate pages, with the table number and table title centered above the table and explanatory notes below the table.
- The figure title and caption material should appear in the legend and not on the figure. Legends should be typed double-spaced on pages separate from the text. Figures should be numbered in one consecutive series in the order in which they are cited in the text. Please include sufficient information in the legends to interpret the figures without reference to the text.
- Illustrations should be clear, with sharp contrast, especially where fine lines such as those of grids or traces are to be retained. Illustrations should be no larger than 8½ × 11 inches, but preferably of a size not needing enlargement or reduction. Non-traceable (raster) line-art and photographs should ideally be provided as TIFFs of at least 600 dpi resolution. Please provide traceable (vector) figures in EPS format. Halftone photographs should be provided as TIFFs of at least 200 dpi resolution.
- References should be cited in the text by Arabic numerals enclosed in square brackets. Only literature that is published or in press (with the name of the journal) may be numbered and listed. Abstracts and letters to the editor may also be cited, but should ideally be less than three years old and identified as such after the title, e.g., [Abstract] or [Letter to Editor]. The references section should be typed double-spaced on pages separate from the text and numbered consecutively in the order in which references are cited in text. Included are last names and initials of authors, title of article, name of publication, year published, volume, and inclusive pages. For references with more than six authors, the fourth and subsequent authors should be replaced with “et al.”; for references with between one and six authors all the authors should be listed. Abbreviations should conform to those used in Index Medicus. References must be verified by the authors against original documents. We recommend the use of tools such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. The style and punctuation of the references conform to the following examples (text enclosed in [I] symbols below, should be italicized in the manuscript):

Article:

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, et al. Fecal bile acids, short-chain fatty acids, and bacteria after ileal pouch–anal anastomosis do not differ in patients with pouchitis. [I]Dig Dis Sci[I]. 1995;40:1471–1483.

Book:

Banks PA. [I]Pancreatitis[I]. New York, NY: Plenum Medical; 1979.

Contribution to a Book:

Creutzfeldt W. Endocrine tumors of the pancreas. In: Volk BW, Wellmann KF, eds. [I]The Diabetic Pancreas[I]. New York, NY: Plenum Medical; 1977:551–590.

Electronic:

ISI Web of Knowledge. Journal Citation Reports, 2007 JCR Science Edition. Available at: <http://isiwebofknowledge.com>. Accessed June 20, 2008.

For authors using EndNote, an output style is available that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 1 kB)

COPYRIGHT

Submission of a manuscript to Digestive Diseases and Sciences is a representation that the manuscript has not been published previously in any form, including symposia and proceedings of meeting, except in brief abstract form, and is not currently under consideration for publication elsewhere. Once a manuscript is accepted by the editorial office, authors (or their employers, if they hold the copyright) must sign a statement transferring copyright to Springer Science+Business Media, Inc., before the manuscript can be officially accepted for publication. Authors will receive the statement via email from the production editor; they need not provide a copyright transfer at manuscript submission. Such a written transfer, which previously was assumed to be implicit in the act of submitting a manuscript, is necessary under the U.S. Copyright Law in order for the publisher to carry through the dissemination of research results and reviews as widely and effectively as possible.

SPRINGER OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition, is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit

<http://www.springeronline.com/openchoice> to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

<http://www.springeronline.com/openchoice/>

ABBREVIATION

The correct abbreviation of Digestive Diseases and Sciences for abstracting and indexing purposes is: Dig. Dis. Sci. or Dig Dis Sci.

ISSN AND EISSN

The international standard serial number (ISSN) for Digestive Diseases and Sciences is 0163-2116, and the electronic international standard serial number (EISSN) is 1573-2568.

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンググループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンググループ ジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및 신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

INQUIRIES

All inquiries should be addressed to the editor-in-chief or to the managing editor, preferably by email:

Editor-in-Chief

Jonathan D. Kaunitz, MD, FACG, AGAF

UCLA School of Medicine

Bldg. 114, 217E

West Los Angeles VAMC

Los Angeles, CA 90073

Tel: 310 268 3879

Fax: 310 268 4811

Managing Editor

Meghan Keeffe

Email: dds.journal@gmail.com

[Por ISSN do Periódico](#)
[Por Título do Periódico](#)
[Por Classificação / Área de Avaliação](#)
[Lista Completa](#)

Título:

| ISSN | Título | Estrato | Área de Avaliação | Classificação |
|-----------|---------------------------------|---------|------------------------|----------------------------|
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | INTERDISCIPLINAR | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | A2 | SAÚDE COLETIVA | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | MEDICINA III | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B2 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | FARMÁCIA | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | MEDICINA I | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | MEDICINA II | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | MEDICINA VETERINÁRIA | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I | Atualizado |
| 0163-2116 | Digestive Diseases and Sciences | B1 | ODONTOLOGIA | Atualizado |

«« 1 2 »»

Artigo 3: Exercício físico moderado protege os neurônios mientéricos e reduz a parasitemia na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Resumo

Para avaliar a parasitemia, neurônios nitrérgicos e citocinas em camundongos infectados por *T. cruzi* submetidos ao exercício físico moderado, 40 camundongos suíços machos, 30 dias de vida foram distribuídos: Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). O programa de exercício físico moderado em esteira rolante teve duração de oito semanas. Três dias após o término do exercício TI e SI foram inoculados com 1300 tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*-cepa Y e a parasitemia foi avaliada do 4º. ao 22º. dias após inoculação. Após 75 dias de infecção foram dosadas citocinas e os neurônios do cólon foram quantificados e mensurados usando imunofluorescência para identificação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Os resultados foram comparados utilizando ANOVA-Tukey e Kruskal-Wallis, significância 5%. O exercício físico moderado reduziu o pico de parasitos no 8º dia de infecção e a parasitemia total ($p < 0,05$). Contribuiu para a sobrevivência do número de neurônios imunorreativos a nNOS no grupo TI x SI ($p < 0,01$). Promoveu hipertrofia de neurônios TI x SI ($p < 0,05$) e aumento da síntese de TNF- α ($p < 0,01$) e TGF- β TI x SI ($p > 0,05$). O exercício físico moderado traz benefícios ao hospedeiro com infecção aguda e crônica por *T. cruzi*, interferindo na modulação do sistema imune preservando neurônios nitrérgicos.

Palavras-chave: Treinamento físico, *Trypanosoma cruzi*, fase aguda, parasitemia, doença de Chagas, cólon, plexo mientérico, neurônio nitrérgico, TNF- α , TGF- β .

Introdução

A doença de Chagas é uma parasitose causada por *Trypanosoma cruzi* e atinge várias regiões do continente americano, particularmente a América Latina por ser considerada endêmica (World Health Organization, 2013). Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas estejam infectadas por este parasito nesta região, e 25 milhões expostas ao risco de contrair a infecção nos países onde a doença é prevalente (World Health Organization, 2013). No Brasil aproximadamente três milhões de pessoas estão infectadas atualmente (Portal da Saúde, 2013).

Com a evolução da doença, o paciente pode apresentar comprometimento cardíaco ou digestivo, ou ainda, cardiodigestivo, devido a mudanças na fisiologia anatômica do miocárdio e do tubo digestório (esôfago e colo, principalmente) (Lana e Tafuri, 2011). No tubo

digestório ocorre comprometimento do trânsito gastrointestinal decorrente da redução de peristaltismo (Lana e Tafuri, 2011). Os movimentos peristálticos são promovidos por neurônios excitatórios e inibitórios do Sistema Nervoso Entérico – (SNE) (Furness, 2000). Os inibitórios representam 18% do total de neurônios do plexo mientérico onde há neurônios nitrérgicos, responsáveis pelos reflexos de dilatação da musculatura lisa intestinal (Furness, 2000). Na ausência de peristaltismo intestinal, o indivíduo passa a apresentar acúmulo do bolo fecal e conseqüentemente, desenvolvimento de megacolo com dilatação permanente e difusa da víscera comprometida (Lana e Tafuri, 2011). Diante deste contexto, investigações a cerca de neurônios nitrérgicos envolvendo tratamento alternativo para a doença de Chagas, fazem-se necessárias, visto que o *T. cruzi* promove destruição de neurônios do SNE.

Os medicamentos para tratamento da doença de Chagas são o benzonidazol e o nifurtimox. Ambos, quando administrados durante a fase aguda da infecção, podem curar até 70% dos pacientes. No entanto, apresentam eficácia limitada no tratamento da fase crônica da doença (Coura e Castro, 2002; Cançado, 2002). Apesar disso, pacientes que foram submetidos ao tratamento etiológico podem apresentar sintomas de constipação e complicações intestinais graves (Santos Júnior, 2002), consistindo em um grande desafio a implantação de medidas alternativas para a melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

Buscam-se trabalhos complementares na literatura sobre tratamento alternativo para a doença de Chagas em nível de pesquisa, dentre eles, a homeopatia (Aleixo et al., 2008; Pupulin et al., 2010). A prática de exercício físico moderado tem contribuído de forma significativa na sobrevivência de neurônios mientéricos (Silva, 2006), melhora do apetite, capacidade funcional e bem estar geral por mudanças de humor positivo, em doenças gastrointestinais (Lopes et al., 2011). Além disso, a prática de exercício físico moderado representa um fator de resistência para o desenvolvimento de infecções causadas por protozoários em animais (Malm, 2006). Estimula a resposta imunológica (Rosa e Vaisberg, 2002; Malm, 2004; Nagatomi, 2006), e modula positivamente as alterações neuroimunoendócrina em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (Rosa e Júnior, 2005). Pesquisas realizadas com animais, onde é possível controlar a carga de exercício físico e a presença de agente infeccioso, mostram os seus resultados (Schebeleski-Soares et al., 2009). No entanto, não estão disponíveis relatos de alterações produzidas sobre os neurônios nitrérgicos do cólon de camundongos submetidos ao exercício físico moderado e infectados por *T. cruzi*.

Sendo assim, este trabalho verificou os efeitos do exercício físico moderado sobre a parasitemia, neurônios nitrérgicos do plexo mientérico e produção de citocinas pró e anti-inflamatória em camundongos infectados por *T. cruzi*.

Materiais e métodos

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentação (CEAE), da Universidade Estadual de Maringá-Brasil (Parecer 046/2009).

Animais

O experimento foi realizado como ensaio cego, controlado, randomizado por sorteio e repetido duas vezes. Foram utilizados em cada repetição 40 camundongos suíços machos, com 30 dias de idade, distribuídos em dois grupos: Treinados (n=20) e Sedentários (n=20). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno (dimensão 414 x 344 x 168mm) tampadas com grade zincada com depressão central para deposição da ração e garrafa de água. As caixas forradas com maravalha foram limpas duas vezes na semana, permanecendo em biotério climatizado (temperatura entre 21 e 23°C) com ciclo claro/escuro de 12 horas com água (clorada) e ração (Nuvilab Cr-1[®] da Nuvital[®]) disponíveis *ad libitum*.

Protocolo de exercício físico moderado

Os animais com 30 dias de vida foram submetidos ao programa de exercício físico aeróbio em esteira rolante (*Inbrasport*[®] modelo *Classic CI*[®], Maringá, Brasil), durante oito semanas, sendo composto por uma sessão diária de treinamento, cinco vezes na semana, com duração de 30 a 45 minutos com velocidade de seis a 14 m/min na primeira semana, 45 a 60 minutos e velocidade de oito a 16 m/min na segunda semana e 60 minutos com velocidade de 10 a 20 m/min nas demais (velocidade média de 13 m/min nas quatro primeiras semanas e de 17,5 m/min nas quatro últimas), com início a partir das 18h00m (ciclo escuro - respeitando o hábito noturno dos animais), temperatura entre 20 e 22° C. O protocolo de exercício físico que foi utilizado corresponde a um esforço moderado (Lerman et al., 2002; Schebeleski-Soares et al., 2009).

A esteira possui adaptador para treinamento de animais de pequeno porte e um sistema que permite a programação das sessões de treinamento e controle digital da velocidade com

sensibilidade de dois metros por minuto (m/min). O treinamento foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Esforço do Departamento de Ciências fisiológicas (LABFISE/DFS/UEM). Não foram utilizados mecanismos de choque ou similares para induzir o animal a se exercitar, assim como foi adaptado um suporte de papelão na parte superior de cada raia para que os animais que se cansassem tivessem opção de descansar durante o treinamento.

Infecção

Após o término do programa de exercício físico moderado, os animais foram redistribuídos em quatro grupos: Treinado Controle (TC) submetido ao exercício físico e não infectado (n=10); Treinado Infectado (TI) submetido ao exercício físico e posteriormente infectado (n=10); Sedentário Controle (SC) mantido sedentário e não infectado (n=10) e Sedentário Infectado (SI) mantido sedentário e posteriormente infectado (n=10).

Foi utilizado inóculo de 1300 formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi*, (via i.p.). Os grupos TI e SI foram inoculados três dias após o término do programa de exercício físico. A infecção crônica foi obtida com cinco doses de BENZNIDAZOL (LAFEPE-PE/Brasil), três doses (100mg/Kg/m.c. aos 11, 15 e 22 dias após a inoculação, dpi) e duas doses (250mg/Kg/m.c. aos 18 e 41 dpi), via oral-gavagem.

Avaliação da evolução da infecção

A parasitemia foi avaliada em todos os animais infectados, utilizando a técnica de Brener (1962). A contagem de parasitos foi realizada diariamente do 4º ao 9º dias após a inoculação (dpi) e em dias alternados do 9º ao 22º dpi. A curva foi traçada utilizando a parasitemia média dos animais inoculados para cada grupo. Foram obtidos:

- ✓ Período pré-patente: tempo médio, em dias, entre o dia da inoculação experimental e o dia no qual foi observada positividade no exame de sangue a fresco para cada grupo;
- ✓ Período patente: tempo médio, em dias, que cada grupo apresentou parasitemia detectada no exame de sangue a fresco;
- ✓ Pico de parasitos: representado pelo maior número de parasitos observados em cada grupo a partir da curva de parasitemia média;
- ✓ Parasitemia total: média da soma do número de parasitos de cada animal;
- ✓ Mortalidade: foi e anotada ao longo de todo o experimento por um período de 75 dias e expressa em %.

- ✓ Massa corporal dos animais: foi verificada uma vez por semana durante todo o experimento.

Eutanásia e coleta de órgãos

Aos 75 dpi, todos os animais foram mortos em câmara de sacrifício com *overdose* de vapores éter etílico. O cólon de cinco animais de cada grupo foi retirado, lavado com tampão fosfato salinado (PBS) 0,1 M pH 7,4, preenchido e armazenado em solução Zamboni por 18 horas. Na sequência, foi desidratado em série crescente de álcool (80, 95 e 100%), diafanizado em xilol, reidratado em série decrescente de álcool (100, 95 e 80%) e armazenado em PBS. Depois, os segmentos foram microdissecados para a obtenção de preparados totais da túnica muscular contendo o plexo mientérico. Os preparados foram submetidos à técnica de Imunohistoquímica para evidenciação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Os preparados foram inicialmente lavados em PBS com Triton 0,5% (Sigma, St, Louis, MO, USA) e bloqueados com PBS com albumina bovina serica (BSA; Sigma, St, Louis, MO, USA) 2% à temperatura ambiente. Na sequência, foram incubados em solução contendo o anticorpo primário específico para nNOS produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluído em PBS, BSA 2%, Triton X-100 0,1% em temperatura ambiente sob agitação por 48 hs. Os preparados totais foram lavados em PBS e incubados em solução contendo o anticorpo secundário anti-rabbit Alexia Fluor 488 (Molecular Probes-Invitrogen) por duas horas. Por último, foram lavados com PBS e montados entre lâmina e lamínula com glicerol tamponado (9:1) e armazenados na geladeira. O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário (Tronchini et al., 2012).

Análise quantitativa e morfométrica de neurônios imunorreativos a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

Foram quantificados todos os neurônios imunorreativos presentes em vinte campos microscópicos. Mensuradas a área (μm^2) do corpo celular e do núcleo de 50 neurônios do plexo mientérico distribuídos equitativamente por toda a região mesocólica. Para estas avaliações foram utilizadas imagens capturadas por câmera de alta resolução (AxioCam Zeiss, Jena, Alemanha[®]) acoplada a microscópio de luz (Axioskop Plus Zeiss[®]) com filtros para imunofluorescência (FITC) e objetiva de 20X. As imagens foram transferidas para microcomputador e analisadas com o software Motic Images Plus 2.0, São Paulo, Brasil.

Dosagem de citocinas

Foram dosadas Interleucina-10 (IL-10), Interferon- γ (IFN- γ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Fator de crescimento transformador- β (TGF- β). Foi utilizado o plasma de dez animais por grupo e a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) de captura, com pares de anticorpos da R&D system Inc[®] (Minneapolis-USA). A técnica foi desenvolvida de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As concentrações das citocinas foram determinadas com referência à curva padrão obtida com citocina murina recombinante. Os resultados foram expressos em pg/mL para IL-10, IFN- γ e TNF- α e em ng/mL para TGF- β .

Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada com o teste D'Agostino Pearson e/ou Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal foram expressos como média \pm desvio-padrão e comparados com o teste ANOVA-Tukey. Dados com distribuição não especificada foram expressos como mediana e percentis 25 e 75 (P25 e P75) e comparados com o teste Kruskal-Wallis e teste das Medianas. Foi utilizado nível de significância de 5% e o programa BioEstat 5.0[®]. Foi realizada estatística de efeito site (<http://www.uccs.edu/~lbecker/>), utilizando-se o teste *Effect size calculators*, verificando-se a intensidade do efeito do exercício físico em relação ao sedentarismo sobre a infecção murina por *T. cruzi*. O efeito foi considerado pequeno quando observado resultado $\leq 0,2$. Médio quando é observado efeito $> 0,2$ a $\leq 0,5$ e grande quando é observado efeito $> 0,5$.

Resultados

Evolução da infecção

A curva de parasitemia apresentou perfil característico da cepa Y de *T. cruzi* nos dois grupos infectados. Os picos de parasitos no 8^o, 9^o e 11^o dias de infecção e a parasitemia total foram 64,2%, 56,1%, 96,8% e 60,0% ($p < 0,05$) menores no grupo TI que o observado em animais do grupo SI (Figura 1 e Tabela 1). Não houve diferença estatística entre os grupos para infectividade, período pré-patente e período patente assim como para a mortalidade (Figura 1 e Tabela 1) ($p > 0,05$).

Durante a infecção a massa corporal dos animais manteve-se estável para os dois grupos ($p = 0,9823$). Não houve alterações significantes no comprimento, diâmetro e área total do cólon dos camundongos avaliados ($p > 0,05$).

Análise quantitativa de neurônios mientéricos imunorreativos a nNOS

As figuras 2A e 3 detalham as comparações de neurônios imunorreativos a nNOS entre os grupos estudados. O exercício físico moderado protegeu os neurônios imunorreativos a nNOS em 10,3%. Este dado é resultante da subtração do percentual da comparação de animais treinados (TC x TI = 38,4% - $p < 0,01$) menos o percentual da comparação entre animais sedentários (SC x SI = 48,7% - $p < 0,01$).

Quando o número de neurônios foi projetado para a área total do cólon observou-se que o exercício físico moderado impediu significativamente a morte de neurônios imunorreativos a nNOS em 16,8%. Este número é resultante da subtração do percentual da comparação de animais treinados (TI x TC = 36,5% - $p < 0,01$) menos o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 53,3% - $p < 0,01$) (Figura - 2B e 3). A proteção de neurônios nitrérgicos obtida foi confirmada pela estatística de efeito verificando-se “efeito grande” de 1,0 para a comparação (TI x SI).

Morfometria de neurônios mientéricos imunorreativos a nNOS

O exercício físico moderado nos animais treinados (TI x TC) promoveu aumento de 4,9% da área nuclear ($p > 0,05$), 14,6% da área citoplasmática ($p < 0,05$) e consequentemente 11,3% da área do corpo neuronal ($p < 0,05$). Nos animais sedentários (SI x SC) a infecção promoveu redução de 3,4% da área nuclear ($p > 0,05$), 17,0% da área citoplasmática ($p < 0,05$) e consequentemente 14,7% da área do corpo neuronal ($p < 0,05$). O resultado da subtração entre os valores (11,3 – 14,7) fornece o benefício do exercício físico moderado sobre neurônios mientéricos em animais infectados que foi de 3,4% que significa “efeito pequeno” de 0,1 (Figura - 4A, B e C).

Dosagem de citocinas

A figura 5A mostra a comparação dos grupos para a produção de TNF- α . O exercício físico moderado proporcionou aumento significativo da síntese de TNF- α de 18,0% ($p < 0,01$). Este dado é resultante da variação entre o percentual de comparação de animais treinados (TC x TI = 23,4% - $p < 0,01$) e o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 41,3% - $p < 0,01$), confirmado pela estatística de efeito onde foi verificado “efeito grande” de 1,3 para a comparação (TI x SI).

A figura 5B apresenta a comparação dos grupos para a produção de TGF- β . O exercício físico moderado proporcionou aumento não significativo da síntese de TGF- β em 18,0%. Este dado é resultante da variação entre o percentual da comparação de animais

treinados (TC x TI = 21,4% - $p < 0,01$) e o percentual da comparação entre animais sedentários (SI x SC = 39,0% - $p < 0,01$), com “efeito grande” de 0,7 para esta comparação. Não foram observados níveis detectáveis para IFN- γ e IL-10, nas condições experimentais avaliadas.

Discussão

O exercício físico moderado vem apresentando resistência para o desenvolvimento de infecções causadas por protozoários em animais (Schebeleski-Soares et al., 2009). Fato este comprovado no presente estudo com a modificação na evolução da curva de parasitemia pelo exercício físico moderado em relação ao sedentarismo. Os picos de parasitos no 8º e 9º e 11º dias de infecção e a parasitemia total foram significativamente menores no grupo TI que o observado em animais do grupo SI.

Redução significativa no pico de parasitos (8º dia de infecção) e na parasitemia total também foi observada por (Moreira et al., 2013), num estudo anterior quando avaliaram a influência do exercício físico moderado em camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* durante a fase aguda. Por Schebeleski-Soares et al. (2009) e Occhi et al. (2012) redução no pico de parasitos em camundongos BALB/c fêmeas em camundongos de duas linhagens distintas de ambos os sexos treinados e infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Na infecção murina por *T. cruzi* maior parasitemia está relacionada à maior morbidade e patogenicidade (Lana e Tafuri apud Neves, 2011). No presente estudo, visto que o exercício moderado diminuiu os índices parasitêmicos, promoveu benefício para os animais infectados.

Neste estudo não foi observado diferença significativa mortalidade e na massa corporal dos animais entre os grupos TI e SI durante a evolução da infecção. Este fato provavelmente deveu-se a ação do sistema imune associado à prática do exercício físico moderado e ao tratamento descontínuo com o benznidazol para cronificação da infecção. Este fármaco, embora não apresente completa eficácia de cura, impede a evolução da parasitemia que é, em última análise, uma das causas de morbidade da infecção por *T. cruzi* (Coura and Castro, 2002, Cançado, 2002; Occhi et al., 2012). A mortalidade de todos os animais treinados e infectados por *T. cruzi*, durante a fase aguda da infecção e não tratados com benznidazol observada no trabalho de Schebeleski-Soares et al. (2009), serviu de referência para a administração de várias doses da droga em diferentes períodos experimentais para a cronicidade da infecção em camundongos, uma vez que o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do exercício físico moderado, não só na fase aguda da infecção, mas também na crônica.

A modificação da evolução da infecção pelo exercício físico moderado proporcionou proteção significativa aos neurônios com imunorreatividade a nNOS, tanto na área amostral estudada (10,3%), quanto para a projeção do número de neurônios na área total do cólon (16,8%) ($p < 0,01$). Ambos os dados resultaram em “efeito grande” do exercício para proteção destes neurônios. A técnica imunohistoquímica marca neurônios nitrérgicos através de um anticorpo específico para a enzima Óxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS) (Tronchini et al., 2012). A nNOS é o principal efetor para a biossíntese de Óxido Nítrico (ON), responsável pela dilatação da musculatura lisa intestinal (Furness, 2000). Dessa forma, foi possível observar que o exercício físico moderado foi significativamente importante para manutenção do peristaltismo intestinal. Em pacientes humanos, já havia sido observado os benefícios da prática de exercício físico moderado (Mendes et al., 2011). Mulheres chagásicas que praticaram duas sessões semanais de exercício físico em um dia durante seis semanas em esteira, foram observados redução significativa da pressão arterial e frequência respiratória e aumento do consumo de oxigênio (Mendes et al., 2011), reforçando a importância de integrar um programa de atividade física para proporcionar melhor atendimento aos pacientes infectados por *T. cruzi*.

A infecção, nos animais sedentários, promoveu redução significativa no número de neurônios imunorreativos à nNOS (SI x SC). Contudo, esta redução não se relacionou às alterações anatômicas da área do cólon dos animais infectados, visto que o comprimento e o diâmetro do órgão mantiveram-se inalterados. Um estudo realizado com pacientes humanos com megacolo chagásico e sem mega não chagásico, mostrou redução significativa do número de neurônios com imunorreatividade à nNOS em pacientes com megacolo chagásico quando comparado aos não chagásicos (Da Silveira et al., 2007).

No presente estudo os animais do grupo TC, apresentaram percentual neuronal com imunorreatividade à nNOS significativamente maior que os demais grupos. Os dados neuronais obtidos nos grupos TC e SC diferem com os encontrados por Gagliardo et al. (2008) que ao investigarem o número de neurônios marcados com a NADPH-diaforase no cólon de ratos controles e sedentários, respectivamente com seis e 12 meses de idade e grupo submetido a programa de atividade física 12 meses de idade (corrida em esteira) durante seis meses, não observaram preservação da população neuronal nitrérgica em ratos treinados em relação aos sedentários com 12 meses de idade. De acordo com Scherer-Singler et al. (1983), a técnica histoquímica da NADPH-d também marca neurônios nitrérgicos por meio da ativação da enzima NADPH-d, localizada na matriz mitocondrial.

Em relação à morfometria neuronal mientérica, foi possível observar que os neurônios sobreviventes imunorreativos à nNOS nos animais do grupo TI apresentaram hipertrofia com aumento da área nuclear e citoplasmática em relação aos animais do grupo SI, conferida pelo exercício físico moderado e/ou pela infecção, confirmada pela estatística de efeito com “efeito pequeno” de 0,1. O fato de a área nuclear e citoplasmática neuronal estarem aumentadas é sugestivo do aumento da transcrição da sequência de DNA do neurônio relativo à síntese da nNOS, com aumento da formação do RNA mensageiro no núcleo neuronal e tradução em proteína pelos ribossomos e formação ativa da nNOS no citoplasma neuronal. Dentro deste contexto, o aumento do corpo neuronal pelo exercício físico moderado contribuiu para a melhora da condição do animal em nível celular, indicando que a prática do exercício físico moderado faz-se necessária para a manutenção do controle do peristaltismo intestinal.

Dados semelhantes ao deste estudo foram encontrados por Silva (2006), que observou aumento na área do corpo de neurônios NADPH-diaforase no ceco de ratos com 12 meses de idade submetidos ao exercício físico (corrida em esteira) durante seis meses, em relação ao grupo com 12 meses sedentários, tanto na região apical quanto na basal.

De acordo com a literatura Abbas et al. (2008), as citocinas TNF- α , TGF- β , IFN- γ e IL-10 estão envolvidas no controle da infecção por *T. cruzi*, sendo sintetizadas de acordo com o tempo de infecção. Além disso, o exercício físico moderado atua como estimulador da resposta imunológica (Rosa and Júnior, 2005). Dessa forma, no presente estudo considerou-se a importância de se investigar a síntese destas citocinas em camundongos com 75 dias de infecção por *T. cruzi* pós exercício físico.

Os animais do grupo TI produziram significativamente mais TNF- α que os animais do grupo SI. Aumento este confirmado pela estatística de efeito (“grande efeito” de 1,3). Alguns autores sugerem que o TNF- α associado ao IFN- γ estimula os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO) que, dependendo de sua origem atua no controle da replicação intracelular do *T. cruzi* (Gazzinelli et al., 1992; Machado et al., 2000). Visto que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e no presente estudo o mesmo foi investigado em animais com 75 dias de infecção, sugere-se que o aumento significativo desta citocina na fase crônica seja herança da ativação de sua síntese durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, o que justifica a redução da curva de parasitemia na fase aguda e proteção de neurônios imunorreativos a nNOS na fase crônica. Embora não significativo, os animais treinados produziram maiores concentrações de TNF- α que os animais sedentários, independente de estarem infectados ou não ($p > 0,05$).

O TNF- α e IFN- γ são citocinas relevantes na ativação de macrófagos por destruírem os parasitos por liberação de NO. Dessa forma, o parasito passa a ser continuamente combatido, tendo sua multiplicação reduzida. Entretanto, ele permanece indefinidamente no hospedeiro, assim como a resposta imunológica (Abbas et al., 2008). Contudo, embora não significante aos 75 dias de infecção observou-se diminuição nas concentrações dessa citocina nos animais do grupo SI em relação aos do grupo SC ($p>0,05$). Por outro lado, Soares et al. (2010), ao trabalharem com animais treinados e posteriormente infectados com a cepa Y de *T. cruzi* no 13º dia de infecção, observaram aumento significativo na produção de TNF- α em animais sedentários infectados em relação ao seu controle (SI x SC). Deve ser destacado que as dosagens de Soares et al. (2010) foram realizadas no sobrenadante de cultivo de macrófagos peritoneais e no presente trabalho foram realizadas utilizando plasma.

Segundo a literatura, concentrações elevadas de TNF- α leva a caquexia, sendo esta citocina um importante preditor de perda de massa corporal (Anker e Coasts, 1999). Além disso, o NO quando produzido em excesso pode provocar lesão tecidual por seu efeito citotóxico (Garcia et al., 1999). Por outro lado, TGF- β e IL-10 são citocinas com capacidade de inibir a resposta imune do hospedeiro, particularmente as que envolvem macrófagos (Abbas et al., 2008). No presente estudo embora não significante os animais treinados e infectados (TI) apresentaram aumento da síntese de TGF- β com “efeito grande” de 0,7 para a comparação (TI x SI), enfatizando a importância da prática do exercício físico moderado para a regulação imune e controle da ativação de macrófagos em resposta às alterações fisiológicas decorrentes da infecção por *T. cruzi* no hospedeiro.

A infecção promoveu diminuição nas concentrações de TGF- β nos animais do grupo SI em relação aos do grupo SC ($p>0,05$). O fato do TGF- β ser uma citocina antiinflamatória Ding et al. (1990), justifica a baixa concentração nos animais SI, visto que a dosagem dessa citocina foi realizada durante a fase crônica da infecção, 75 dias. Investigações realizadas em fragmentos do miocárdio de pacientes humanos com cardiopatia chagásica crônica e insuficiência cardíaca congestiva, após irem a óbito, mostraram que o TGF- β estava pouco expresso, sugerindo algum fator inibitório atuando sobre macrófagos, podendo corresponder à imunodepressão devido à presença de *T. cruzi* (Reis et al., 2000).

Embora a literatura disponibilize um número crescente de trabalhos sobre exercício físico e sistema imune (Espersen et al., 1990; Dufaux and Order, 1989; Walsh et al., 2011), a produção das diferentes citocinas não está totalmente esclarecida, particularmente quando há envolvimento da infecção por *T. cruzi*. Nas condições experimentais avaliadas no presente

estudo não foram observados níveis detectáveis para IFN- γ e IL-10. Este resultado contribui para o entendimento da dinâmica de produção de citocinas no modelo experimental utilizando camundongos com 75 dias de infecção por *T. cruzi* após oito semanas de exercício aeróbio moderado em esteira rolante.

Conclusão

O exercício físico moderado inibe a evolução da infecção aguda por *T. cruzi* diminuindo a curva de parasitemia, protege os neurônios nitrérgicos e induz a hipertrofia neuronal, significando melhor prognóstico ao animal cronicamente infectado com relação à manutenção do peristaltismo intestinal e modula o sistema imunológico, aumentando a síntese de TNF- α , TGF- β . Estes resultados aprofundam a fundamentação já consistente e sólida dos benefícios que os exercícios físicos moderados representam para a população de maneira geral e agora, especificamente para indivíduos parasitados por *T. cruzi*.

Agradecimentos

Os autores agradecem a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) e *Fundação Araucária* do Paraná, pelo apoio financeiro.

TABELAS E GRÁFICOS

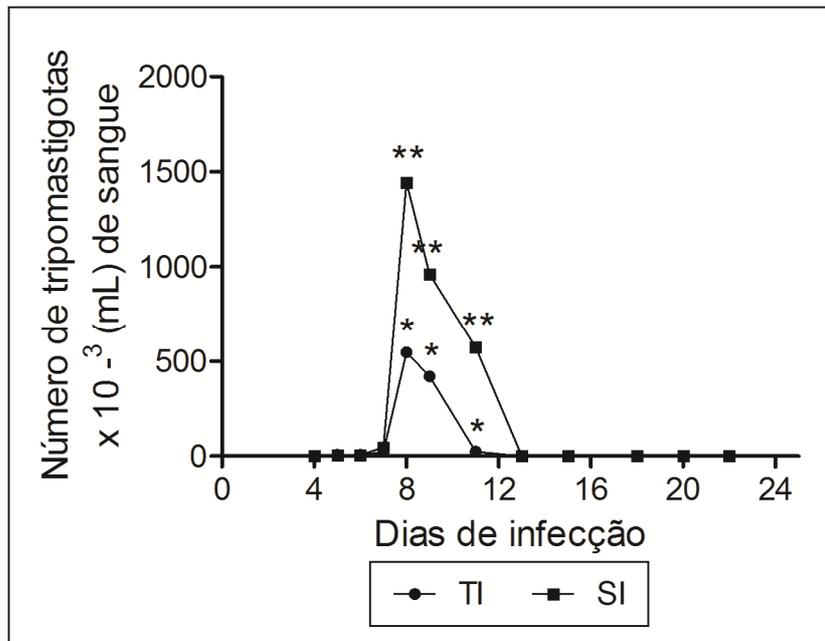


Figura 1 – Curva de parasitemia média em camundongos, suíços, machos, após 12 semanas de idade, Treinado infectado (TI) ou Sedentário Infectado (SI). Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. Símbolos diferentes (*, **) representam diferença estatística. Comparação entre TI x SI ($p < 0,05$). Teste: Mann-Whitney.

Tabela 1 – Parâmetros parasitológicos avaliados em camundongos, suíços, machos, após 12 semanas de idade, Treinado infectado (TI) e Sedentário Infectado (SI).

| Grupo | Infectividade (%) | Período Pré-Patente (dias) | Período Patente (dias) | Pico de Parasitos (tripomastigotas/mL X 10 ⁶) | Parasitemia Total (tripomastigotas/mL X 10 ⁶) |
|-------------|-------------------|----------------------------|------------------------|---|---|
| TI (n = 10) | 100 | 6,4 ± 1,8 | 6,1 ± 1,8 | 0,5 ^a ± 0,3 | 1,2 ^a ± 0,4 |
| SI (n = 10) | 100 | 4,2 ± 0,4 | 7,0 ± 1,0 | 1,4 ^b ± 0,4 | 3,0 ^b ± 1,0 |

(n = número de animais) Infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. Dados apresentados como média ± desvio-padrão. Letras diferentes (^a, ^b) representam diferença estatística ($p < 0,05$). Teste: Mann-Whitney.

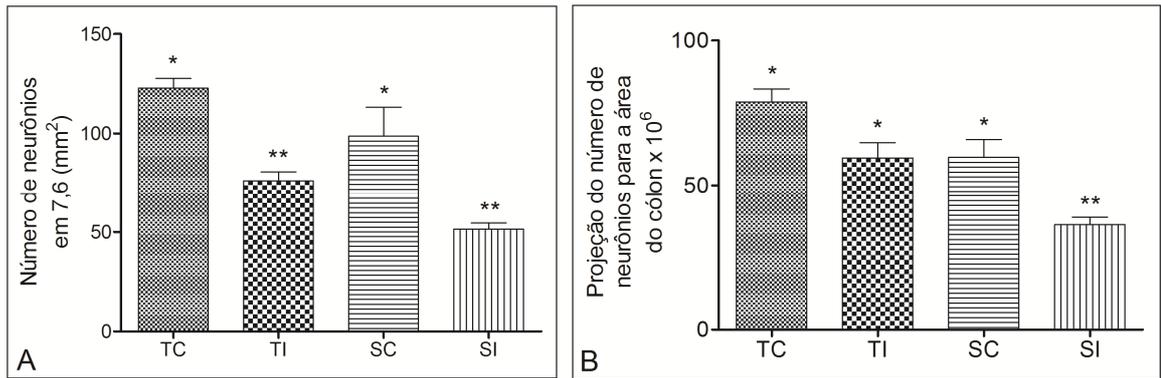


Figura 2 – Média e desvio-padrão dos diferentes parâmetros. **(A)** número de neurônios imunorreativos a nNOS em 20 imagens. **(B)** projeção do número de neurônios para a área do cólon de camundongos com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Aos 75 dias de infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. **(A)** (*, **) = (p<0,01). **(B)** (*, **) = (p<0,05). Teste: ANOVA-Tukey.

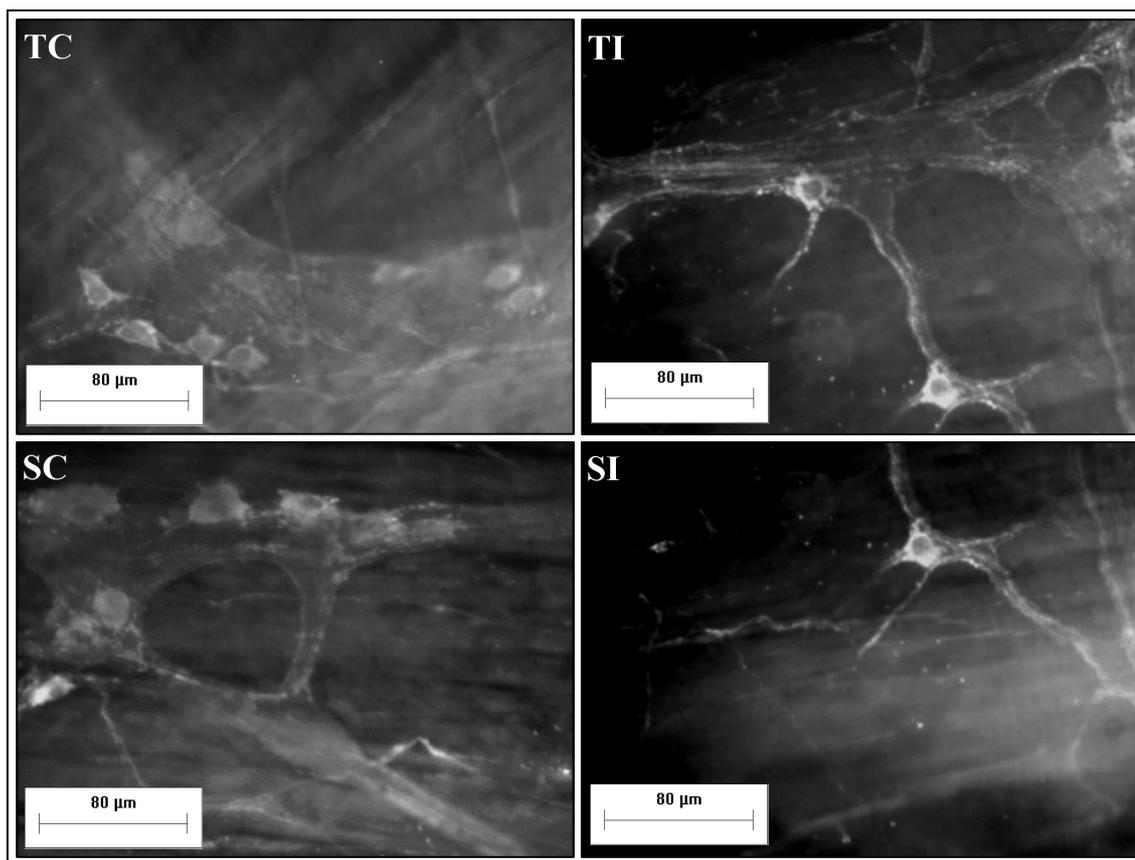


Figura 3 - Microfotografia mostrando gânglio mientérico de neurônios imunorreativos a nNOS do no cólon de camundongos, suíços, machos, com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Aos 75 dias de infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. Microscópio de luz (Axioskop Plus Zeiss®) com filtros para imunofluorescência (FITC), 200 X. Teste: ANOVA-Tukey.

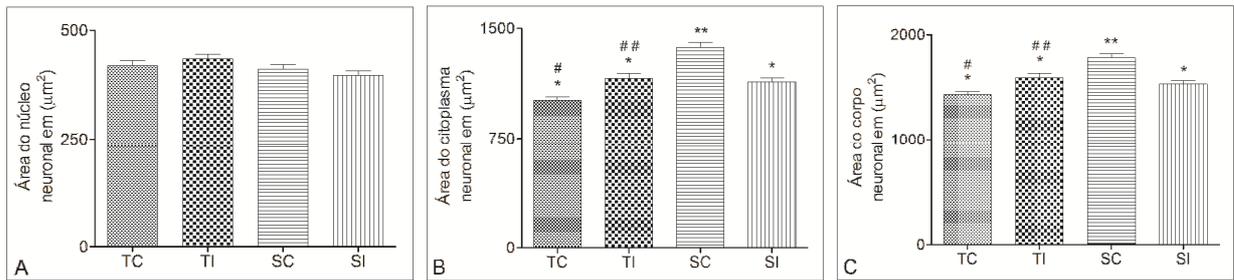


Figura 4 – Média e desvio-padrão dos diferentes parâmetros. (A) área do núcleo neuronal, (B) do citoplasma neuronal, (C) e do corpo neuronal do cólon de camundongos com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Aos 75 dias de infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. Símbolos diferentes (*, **; #, ##) representam diferença estatística ($p < 0,05$). Teste: Kruskal-Wallis.

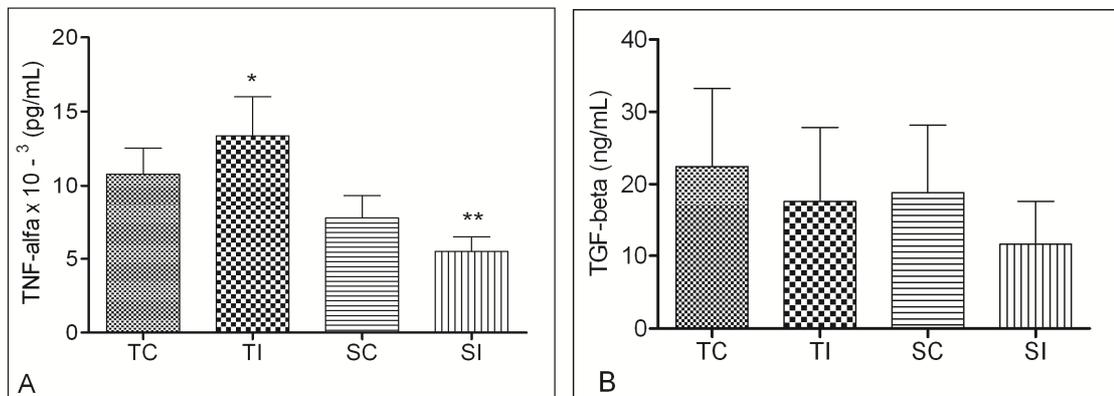


Figura 5 - Média e desvio-padrão dos níveis detectados das citocinas: (A) TNF- α e (B) TGF- β em camundongos suíços machos, com 22 semanas de idade. Treinado Controle (TC), Treinado Infectado (TI), Sedentário Controle (SC) e Sedentário Infectado (SI). Aos 75 dias de infecção com 1300 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y do *T. cruzi*. (A) símbolos diferentes (*, **) representam diferença estatística entre TI SI ($p < 0,05$). Fonte: Moreira et al. (2013). Teste: ANOVA-Tukey.

5. Referências

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2008. *Imunologia celular e molecular*, 6th ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 564 pp.
- Aleixo, D.L., Ferraz, F.N., De Melo, C.S., Gomes, M.L., Toledo, M.J.O., Kaneshima, E.N., Bersani-Amado, C.A., Araujo, S.M., 2008. Changes of RAPD profile of *Trypanosoma cruzi* II with Canova and benznidazole. *Homeopathy* 97, 59-64.
- Anker, S.D., Coats, A.J.S., 1999. Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* 115, 836-847.
- Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 4, 389-396.
- Cançado, J.R., 2002. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 44, 29-37.
- Coura, J.R, Castro, S.L., 2002. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 3-24.
- Da Silveira, A.B., D'Ávila Reis, D., De Oliveira, E.C., Neto, S.G., Luquetti, A.O., Poole, D., Correa-Oliveira, R., Furness, J.B., 2007. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Digestive Diseases and Sciences* 52, 2877-2883.
- De Lana, M., Tafuri, W.L., 2011. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Neves, D.P., De Melo, AL., Linardi, P.M., Vitor, R.W.A., (Eds.). *Parasitologia humana*, 12th ed. Atheneu, São Paulo, PP. 89-114.

- Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., Srimal, S., 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β_1 , - β_2 , and - β_3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *Journal of Immunology* 145, 940-944.
- Dufaux, B., Order, U., 1989. Plasma elastase- α_1 -antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *International Journal of Sports Medicine* 10, 434-438.
- Espersen, G.T., Elbaek, A., Ernst, E., Toft, E., Kaalund, S., Jersild, C., 1990. Efeito do exercício físico sobre citocinas e subpopulações de linfócitos no sangue periférico humano. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 98, 395-400.
- Furness, J., 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System* 81: 87-96.
- Gagliardo, M.K., Clebis, N.K., Stabile, S.R., De Britto Mari, R., De Sousa, J.M., De Souza, R.R., 2008. Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. *Autonomic Neuroscience* 141, 31-37.
- Garcia, S.B., Paula, J.S., Giovanetti, G.S., Zenha, F., Ramalho, E.M., Zucoloto, S., Silva, J.S., Cunha, F.Q., 1999. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology* 93, 191-197.
- Gazzinelli, R.T., Oswald, P., Hieny, S., James, S.L., Sher, A. 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *European Journal of Immunology* 22, 2501-2506.
- Lerman, I., Harrison, B.C., Freeman, K., Hewett, T.E., Allen, D.L., Robbins, J., Leinwand, L.A., 2002. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology* 92, 2245-2255.

- Lopes, W.S., Araújo, S.M., Gomes, M.L., 2011. Comparison of blood pressure and heart frequency among women with and without Chagas' disease submitted to physical training. *FIEP Buletin* 81, 603-607.
- Machado, F.S., Martins, G.A., Aliberti, J.C., Mestriner. F.L., Cunha. F.Q., Silva, J.S., 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 24, 3003-3008.
- Malm, C., 2004. Exercise immunology: the current state of man and mouse. *Sports Medicine* 34, 555-566.
- Malm, C., 2006. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 16, 4-6.
- Martinez Gagliardo, K., Clebis, N.K., Stabile, S.R., De Britto Mari, R., De Sousa, J.M., De Souza, R.R., 2008. Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. *Autonomic Neuroscience* 141, 31-37.
- Mendes, M.F.A., Lopes, W.S., Nogueira, G.Â., Wilson, A., Araújo, S.M., Gomes, M.L., 2011. Exercício físico aeróbico em mulheres com doença de Chagas. *Fisioteraphc moviment* 24, 591-60.
- Moreira, N.M., Santos, F.N., Toledo, M.J.O., Moraes, S.M.F., Dalálio, M.M.O., Araújo, E.J.A., Sant`Ana, D.M.G., Araújo, S.M., 2013. Physical exercise reduces parasitemia and protects myenteric neurons in the colon of mice infected by *Trypanosoma cruzi*. *Internation Journal of Experimental Pathalogy* 94, 426-435.
- Nagatomi, R., 2006. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. *Exercise Immunology* 12, 54-71.
- Occhi, R.C., Schebeleski-Soares, C., Franzói-De-Moraes, S.M., Batista, M.R., Kwabara, H.N., De Sousa, A.M.R., Moreira, N.M., Gomes, M.L., Araujo, S.M., 2012. Infecção

experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos: influência do exercício físico versus linhagens e sexos. Revista Brasileira de Medicina do Esporte 18, 51-57.

Portal da Saúde. Available at:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454.
Accessed: January 30, 2013.

Pupulin, A.R.T., Marques-Araújo. S., Toledo, M.J.O., Gomes, M.L., Takejima, E., Cuman, R.K.N., 2010. Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology 126, 435-440.

Rosa, L.F., Vaisberg, M.W., 2002. Influências do Exercício na Reposta Imune. Revista Brasileira de Medicina do Esporte 8, 167-172.

Rosa, L.F.B.P.C., Júnior, M.L.B., 2005. Efeito do treinamento físico modulador positivo nas alterações no eixo neuroimunoendócrino em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica: possível atuação do fator de necrose tumoral- α . Revista Brasileira de Medicina do Esporte 11, 238-242.

Santos Júnior, J.C.M., 2002. Megacólon: Parte II. Doença de Chagas. Revista Brasileira de Coloproctologia 4, 266-267.

Schebeleski-Soares, C., Occhi-Soares, R.C., Franzoi de Moraes, S.M., De Oliveira Dalálio, M., Almeida, F.N., Toledo, M.J.O., Araújo, S.M., 2009. Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism 34, 659-665.

Scherer-Singler, U., Vicent, S.R., Kimura, H., Megeer, E.G., 1983. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. Journal of Neuroscience Methods 9, 229-234.

Silva, E.A., 2006. Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mientérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e

ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses. Master's dissertation. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Soares, C.S., Occhi, R.C., Carvalho, L.G.L., Moraes, S.M.F., Dalálio, M.M.O., Araújo, S.M., 2010. Produção de fator de necrose tumoral-alfa e peróxido de hidrogênio na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos ao exercício. *Acta Scientiarum. Health Science* 32, 57-60.

Tronchini, E.A., Trevisan, A.R., Tashima, C.M., Pereira, E.V.F., Zanoni, J.N., 2012. Supplementation with 0.1% and 2% vitamin E in diabetic rats: analysis of myenteric neurons immunostained for myosin-V and nNOS in the jejunum. *Arquivos de Gastroenterologia* 4, 284-290.

Urbina, J.A., 1997. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 114, 91-99.

Walsh, N.P., Gleeson, M., Shephard, R.J., Gleeson, M., Woods, J.A., Bispo, N.C., Fleshner, M., Green, C., Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L., Rogers, C.J., Northoff, H., Abbasi, A., Simon, P., 2011. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exercise Immunology Review* 17, 6-63.

World Health Organization. Available at:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Accessed: January 30, 2013.

ANEXOS

Experimental Parasitology - Instruções para autores



Introduction

Experimental Parasitology emphasizes modern approaches to parasitology, including molecular biology and immunology. The journal features original research papers on the physiological, metabolic, immunologic, biochemical, nutritional, and chemotherapeutic aspects of parasites and host-parasite relationships.

research papers on the physiological, metabolic, immunologic, biochemical, nutritional, and chemotherapeutic aspects of parasites and host-parasite relationships.

Authors of studies on anti-microbial properties of natural substances are strongly encouraged to submit their work to other, more appropriate journals unless the studies have a strong focus on anti-parasitic activity and address the following points:

- the chemical characterization of the compounds likely implicated to a reasonable degree
- controls for the effects of vehicles and solvents
- if an animal model is not investigated or not available, in vitro activity studies that include at least comparative cytotoxicity data using host cells or tissues to show selective anti-parasitic activity at a level that could indicate a realistic prospect for translation.
- some investigation into the potential mode of action or effects on likely molecular targets in parasites
-



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has reprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:<http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.



Preparation

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s),

journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section

numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Vitae - no photos

Include in the manuscript a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of').

Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be

the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are

correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples:

'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).

Kramer et al. (2010) have recently shown....'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation

files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

[Por ISSN do Periódico](#)
[Por Título do Periódico](#)
[Por Classificação / Área de Avaliação](#)
[Lista Completa](#)

Título:

| ISSN | Título | Estrato | Área de Avaliação | Classificação |
|-----------|------------------------------------|---------|-----------------------|---------------|
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B1 | MEDICINA VETERINÁRIA | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B1 | MEDICINA II | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B2 | CÊNCIAS BIOLÓGICAS II | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B3 | ASTRONOMIA / FÍSICA | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B1 | SAÚDE COLETIVA | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B1 | NUTRIÇÃO | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | A2 | CIÊNCIAS AGRÁRIAS I | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B2 | ENSINO | Atualizado |
| 0014-4894 | Experimental Parasitology | B1 | QUÍMICA | Atualizado |
| 1090-2449 | Experimental Parasitology (Online) | B1 | CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I | Atualizado |

« « 1 2 3 » »

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Este estudo a respeito da influência do exercício físico moderado sobre camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi* mostrou que:

- 1) O exercício físico moderado inibe a evolução da infecção por *T. cruzi*;
- 2) Protege a população neuronal total gástrica, neurônios metabolicamente mais ativos e neurônios nitrérgicos e provoca hipertrofia de neurônios sobreviventes, significando melhor prognóstico ao animal cronicamente infectado com relação à manutenção do peristaltismo intestinal;
- 3) O exercício físico moderado promove aumento da espessura total da parede intestinal;
- 4) Aumento da proporção de linfócitos e células caliciformes;
- 5) Impede a formação de focos inflamatórios na túnica muscular intestinal;
- 6) Aumento da síntese de citocinas TNF- α e TGF- β , mostrando grande importância para a abertura de novas alternativas como forma de tratamento, associada à terapêutica de indivíduos chagásicos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A doença de Chagas, desde sua descoberta em 1909, vem sendo alvo de muitos estudos para diversos pesquisadores. Os resultados obtidos preenchem uma lacuna da literatura e constroem referencial teórico para fortalecer a implantação de tratamento especial direcionado a indivíduos portadores da doença de Chagas. Levam a perspectivas reais de melhoria de atendimento a estes indivíduos num contexto de saúde pública, fortalecendo a necessidade de implantação de atividade física como opção de tratamento complementar direcionado a estes pacientes e mostram a importância de futuros estudos a cerca de:

- 1) Quais mecanismos podem estar envolvidos na redução da parasitemia observada?
- 2) Quais mecanismos estariam envolvidos no impedimento de morte da população neuronal total mientérica e sub-populações neuronais investigadas?
- 3) Quais metabólitos ou substâncias ativas são produzidas durante o exercício físico que garantem benefícios positivos mesmo frente a uma infecção que insiste em neutralizar o esforço do hospedeiro?
- 4) A associação da capsaicina ao exercício físico pode minorar a patogênese da inflamação?
- 5) Como ocorre a morte de neurônios mientéricos na infecção por *T. cruzi*?
- 6) As células da Glia e Cajal podem apresentar alterações quantitativas em animais treinados e posteriormente infectados por *T. cruzi*?