



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO MESTRADO ACADÊMICO

**DESEMPENHO LOCOMOTOR DE
CAMUNDONGOS COM INFECÇÃO
CHAGÁSICA EXPERIMENTAL AGUDA**

BRUNO TEIXEIRA GOES

SALVADOR, 2013



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E
MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO MESTRADO ACADÊMICO

**DESEMPENHO LOCOMOTOR DE
CAMUNDONGOS COM INFECÇÃO
CHAGÁSICA EXPERIMENTAL AGUDA**

**ALUNO:
Bruno Teixeira Goes**

**ORIENTADOR:
Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Pesquisador Titular do CPqGM-FIOCRUZ**

**CO-ORIENTADOR
Dr. Abrahão Fontes Baptista
Professor Adjunto do ICS-UFBA**

SALVADOR, 2013

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, Dr^o Marcos Vannier e Dr^o Abrahão Baptista pelo aprendizado, incentivo e constante inspiração;

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Dr^a Sonia Andrade e Dr^a Cristiane Villarreal e Dr^a Simone Macambira pelas valiosas sugestões;

Aos membros do LBP, pela presteza e dedicação, em especial ao amigo Diego Menezes por me guiar durante todo este período;

Aos alunos de iniciação científica, Diego Rabelo e Vitor Guida pela extrema dedicação em todos os experimentos e discussões;

Ao LACEI e LETI, pelo apoio nas principais etapas deste trabalho, em especial a equipe da Dr^a Cristiane Villarreal e ao colega Márcio Cerqueira pela disponibilidade e auxílio nos momentos de necessidade;

A família e amigos, pelo amor, confiança e orgulho que sentem por esta etapa tão importante para meu futuro;

A Quele Souza, minha futura esposa, por ser tão importante na minha vida.

“A ciência que debatemos ainda está longe de expressar um conhecimento amplo e verdadeiro.”

Abrahão Baptista

GOES, Bruno Teixeira. Desempenho locomotor de camundongos com infecção chagásica experimental. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

A doença de Chagas é responsável por cerca de 15.000 óbitos por ano, principalmente nas Américas do Sul e Central, onde 7-8 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair a doença. A combinação de inflamação muscular e desnervação podem ocorrer durante o curso desta patologia podendo limitar a ativação neuromuscular durante a inflamação e após reparo ou remodelamento da lesão devido a uma complexa reorganização das unidades neuromotoras. Desta forma, faz-se necessário investigar o desempenho locomotor de camundongos com infecção chagásica experimental aguda. Camundongos suíços foram alocados em dois grupos portadores de infecção (cepa Y e Colombiana) e comparados ao grupo controle (sem infecção) quanto ao desempenho locomotor no teste do Campo Aberto, na Escala Basso de avaliação locomotora murina (BMS) e Rota-Rod. Avaliações histopatológicas do músculo cardíaco, esquelético (isquiotibiais e tríceps sural) e nervo isquiático foram realizadas. A infecção pela cepa Y e Colombiana provocou piora do desempenho locomotor a partir do 7º dia de infecção com redução significativa dos quadrados percorridos no teste do campo aberto. A qualidade da marcha foi prejudicada a partir do 9º dia para o grupo cepa Y e 23º dia para o grupo cepa Colombiana sendo caracterizada pela incapacidade de sustentação da cauda e instabilidade moderada ou grave do tronco. Modificação na coordenação e equilíbrio foi observada apenas no grupo cepa Y a partir do 11º dia de infecção quando os animais estavam impossibilitados de realizar o teste. Os resultados do desempenho locomotor estiveram associados a alterações histopatológicas no músculo cardíaco e esquelético e todos os dados deste estudo corroboram com os achados histológicos e com outros modelos de avaliação locomotora encontrados na literatura. O modelo de avaliação proposto neste trabalho possibilitou a caracterização de um padrão nas modificações do desempenho locomotor no modelo experimental de infecção aguda pela cepa Y e Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, lesão neuromuscular.

GOES, Bruno Teixeira. Locomotor performance of mice with experimental Chagas infection. Dissertation (Master's degree)– Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Chagas disease is responsible for about 15,000 deaths per year, mainly in Central and South America, where 7-8 million people are at risk of contracting the disease. The combination of muscle inflammation and denervation may occur during the course of this pathology limiting neuromuscular activation during inflammation and remodeling after injury or repair due to a complex reorganization of neuromotor units. Thus, making it necessary to investigate the locomotor performance of mice with experimental acute Chagas infection. Swiss mice were divided into two groups with the infection (Y strain and Colombian) and compared to the control group (without infection) on the locomotor performance in the Open Field Test, Scale Basso locomotor evaluation murine (BMS) and Rota-Rod. Histopathological evaluations of cardiac muscle, skeletal (hamstrings and triceps surae) and sciatic nerve were performed. Infection by strain Y and Colombian caused worsening of locomotor performance from the 7th day of infection with significant reduction of squares traversed in the open field test. The quality of gait was impaired from the 9th day for group Y strain and 23 days for the group Colombian strain is characterized by the inability to support the tail and moderate or severe instability of the trunk. Change in coordination and balance was observed only in group Y strain from the 11th day of infection when the animals were unable to perform the test. The results of locomotor performance were associated with histopathological changes in cardiac and skeletal muscle and all data in this study corroborate the findings with other histological and locomotor assessment models found in the literature. The evaluation model proposed in this work allowed the characterization of a pattern of changes in locomotor performance in an experimental model of acute infection for the Y and Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, neuromuscular injury

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	11
3 METODOLOGIA	12
4 RESULTADOS	16
4.1 SOBREVIDA CEPA Y	16
4.2 PARASITEMIA CEPA Y	17
4.3 NINHOS PARASITÁRIOS CEPA Y	18
4.4 AVALIAÇÃO LOCOMOTORA CEPA Y	19
4.5 'GROOMING' CEPA Y	24
4.6 FREQUÊNCIA DE EVACUAÇÃO CEPA Y	25
4.7 FREQUÊNCIA DE MICTURIÇÃO CEPA Y	26
4.8 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS CEPA Y	27
4.9 SOBREVIDA CEPA COLOMBIANA	30
4.10 PARASITEMIA CEPA COLOMBIANA	31
4.11 NINHOS PARASITÁRIOS CEPA COLOMBIANA	32
4.12 AVALIAÇÃO LOCOMOTORA CEPA COLOMBIANA	33
4.13 'GROOMING' CEPA COLOMBIANA	38
4.14 FREQUÊNCIA DE EVACUAÇÃO CEPA COLOMBIANA	39
4.15 FREQUÊNCIA DE MICTURIÇÃO CEPA COLOMBIANA	40
4.16 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS CEPA COLOMBIANA	41
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54

INTRODUÇÃO

Estima-se que a doença de Chagas seja responsável por afetar aproximadamente 7-8 milhões de pessoas, levando ao óbito cerca de 15.000 indivíduos por ano, principalmente nas Américas do Sul e Central, onde 25% da população encontra-se em risco de contrair a doença (MONCAYO et al., 2009; OMS, 2013).

Estratégias de controle do vetor nas áreas endêmicas têm levado a uma diminuição da transmissão da infecção pelo *T. cruzi*. Contudo, outras vias, como as infecções congênitas e transfusionais, vêm adquirindo grande importância na transmissão. Recentemente a mídia divulgou a transmissão da doença de Chagas por via oral através de caldos de cana e de açaí, fato que já era conhecido (CAMANDAROBA et al., 2002), mas pode estar assumindo nova relevância em diferentes ecótopos. Presumivelmente, os parasitos exploram novos nichos ecológicos e, assim, faz-se necessária a constante vigilância epidemiológica, bem como a busca de novos regimes diagnósticos e terapêuticos.

Na fase aguda da doença de Chagas, o diagnóstico é estabelecido em menos de 10% dos casos, provavelmente devido a sintomas passageiros e achados laboratoriais inespecíficos. Suas principais características clínicas incluem febre, mialgias, mal-estar, sudorese, hepatoesplenomegalia, insuficiência cardíaca e, menos frequentemente, meningoencefalite. Aproximadamente 95% dos pacientes evoluem para a fase latente (indeterminada) onde permanecem assintomáticos, com sorologia positiva, e não há sinais físicos ou evidência clínica de envolvimento de órgãos (PUNUKOLLU et al., 2007; COURA & BORGES-PEREIRA, 2012, RASSI et al., 2012). Os sintomas e sinais físicos da doença chagásica crônica surgem geralmente associados a problemas cardiovasculares como insuficiência e arritmias cardíacas (PUNUKOLLU et al., 2007) e tromboembolismo arterial ou venoso no músculo esquelético (TORRES et al., 2004) e sistema nervoso central (PITTELLA, 2009).

O modelo de infecção chagásica experimental com camundongos tem sido muito utilizado para estudos da doença de Chagas (OMS, 1977) por apresentar uma fase aguda inicial, onde o nível de parasitas circulantes no sangue é maior (CARDOSO & BRENER, 1980), seguido por uma fase crônica, caracterizada por extenso parasitismo tecidual, além da impossibilidade de se detectar parasitas por métodos diretos. (ANDRADE et al., 1991; MAGALHÃES-SANTOS et al., 2002).

As modificações encontradas no sistema neuromuscular durante o curso da doença de Chagas são caracterizadas por inflamação focal ou difusa no músculo esquelético e/ou cardíaco, presença de amastigotas intra ou extracelulares, destruição de fibras musculares, diminuição da mielina nas fibras nervosas e redução da velocidade de condução do nervo motor e sensorial (LOZAVIO et al., 1989; MAGALHÃES-SANTOS et al., 2004; TORRES et al., 2004; RAMIREZ-ARCHILA et al., 2011). Desta forma, o nível de acometimento do sistema neuromuscular durante a infecção pelo *T. cruzi* tem sido atribuído a processos como autoimunidade, reações mediadas por linfócitos, ‘shedding’ realizado por tripomastigotas, anticorpos para lamininas e neurônios e antígenos parasitários que se aderem nas fibras musculares e terminações nervosas (IOSA et al., 1990; GONÇALVES et al., 1991; KIERSZENBAUM, 1999, 2005; PINHO et al., 2002), porém, a sequência com que estes processos acontecem e quais dos fatores supracitados são mais importantes é uma questão ainda controversa.

Os parasitos possuem uma grande variedade de efeitos consideráveis sobre os seus hospedeiros. Além das alterações patológicas óbvias e imunológicas comumente descritas, mesmo nos casos em que o parasitismo é indetectável, hospedeiros vertebrados podem apresentar alterações na atividade locomotora, alimentação, interações intra e inter-específicas, na seleção de parceiros e reprodução, e resposta a estímulos ambientais (HART, 1990; ZUK, 1992; VANNIER-SANTOS & LENZI 2011). Durante a infecção avançada, camundongos infectados pela cepa Tulahuén perderam peso, pareciam mais fracos e exibiram oscilação durante a marcha associado à inflamação difusa e maior número de centralização de núcleos (ANDERSSON et al., 2003). Além disso, dificuldade respiratória, pelos eriçados e redução no consumo de água e comida pode ser encontrada em camundongos infectados cronicamente pela cepa Colombiana a partir do 14º dia de infecção (FEDERICI et al., 1964). Modificações locomotoras durante a infecção aguda experimental pelas cepas Y e Colombiana do *T. cruzi* não estão relacionadas à perda de peso corporal, apatia e/ou aumento da temperatura dos animais infectados (VILAR-PEREIRA et al., 2012).

A patogênese da lesão tecidual durante a infecção Chagásica depende de elementos inerentes as diferentes cepas do *T. cruzi* como virulência, carga parasitária, tropismo, morfologia das formas sanguícolas e efetividade da resposta imune do hospedeiro (ANDRADE, 1974; MARINHO et al., 2004). Os tipos biológicos que apresentam rápida multiplicação parasitária com picos elevados entre 9 e 10 dias, alta virulência e mortalidade entre 10 e 12 dias de infecção, predomínio de formas delgadas

e acentuado macrofagotropismo no início da infecção com posterior miotropismo, foram categorizadas como Biodema tipo I (ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1996). As cepas que apresentam parasitemia irregular entre 12 e 20 dias de infecção, virulência variável, mortalidade entre 20 e 25 dias, pequeno número de formas delgadas e discreto macrofagotropismo no início da infecção, com lesões miocárdicas em todo o curso da infecção foram categorizadas como Biodema tipo II (ANDRADE, 1974, ANDRADE & MAGALHÃES, 1996).

O comprometimento locomotor induzido pela infecção chagásica experimental aguda e crônica ocorre devido à combinação de inflamação muscular e desnervação que levam a uma complexa remodelação de unidades motoras com afastamento entre as fibras musculares, coexistência de brotamentos axonais com reinervação de fibras musculares desnervadas e redução do número de fibras musculares dentro de uma única unidade motora, desta forma, limitando a ativação neuromuscular durante e após a inflamação (GONZÁLEZ-CAPPA et al., 1987). Evidência de redução na capacidade locomotora espontânea de camundongos foi demonstrada durante o curso da infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (FEDERICI et al., 1964). Este dado é suportado pela presença de sinais de miopatia como centralização nuclear e substituição das fibras musculares por tecido fibroso ou gorduroso associado a características de neurodegeneração periférica e sinais eletromiográficos de lesão neuropática e muscular com a cronificação da infecção pelo *T. cruzi* no modelo murino (LOSAVIO et al., 1989; TEKIEL et al., 2001; SOLANA et al., 2003).

Animais com infecção Chagásica experimental, independente do tipo de cepa, podem apresentar direta ou indiretamente comprometimento do sistema neuro musculoesquelético. Porém, a diversidade apresentada pelas diferentes cepas quanto a interação com o hospedeiro pode determinar modificações distintas quanto a qualidade e quantidade do movimento durante a infecção. Desta forma, a caracterização do desempenho locomotor servirá como importante objeto de estudo para o curso da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

OBJETIVOS

- **Objetivo Geral:**

Investigar o desempenho locomotor de camundongos com infecção chagásica experimental pelas cepas Y e Colombiana durante a fase aguda da doença de Chagas.

- **Objetivos Específicos:**

- Descrever o comportamento dos aspectos quantitativos da locomoção durante a fase aguda da infecção chagásica experimental comparando animais infectados e normais;

- Identificar os principais atributos qualitativos da locomoção comprometidos durante a fase aguda da infecção chagásica experimental comparando animais infectados e normais;

- Realizar a avaliação histológica comparativa do músculo esquelético (isquiotibiais e tríceps sural) e miocárdio dos animais infectados e normais;

- Correlacionar os achados locomotores e histológicos dos animais infectados e normais nos diferentes períodos da fase aguda da infecção chagásica experimental.

METODOLOGIA

- **MODELO EXPERIMENTAL *in vivo*:**

Foram utilizados camundongos suíços, não isogênicos, de ambos os sexos, pesando de 15 a 20 g, provenientes do biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Bahia. Os animais foram mantidos dentro das exigências básicas do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) desta Instituição, protocolo nº 023/09.

- **GRUPOS E EXPERIMENTOS**

Os testes para avaliação do desempenho locomotor do primeiro experimento foram realizados no grupo sem infecção (Grupo Normal-n=13) e com infecção pela cepa Y (Grupo Cepa Y-n=13) por um período de 12 dias. No segundo experimento, os animais utilizados foram alocados no grupo sem infecção (Grupo Normal-n=13) e com infecção pela cepa Colombiana (Grupo Cepa Colombiana-n=13) e avaliados por um período de 43 dias. O terceiro experimento ocorreu após a determinação do padrão das alterações quantitativas e qualitativas da locomoção revelados pelos dois experimentos iniciais. O desenvolvimento desta etapa teve como objetivo a obtenção do material histopatológico dos grupos e confirmação do padrão locomotor encontrado no primeiro e segundo experimento. Para cepa Y os pontos de sacrifício selecionados foram os 7º e 12º dias e para cepa Colombiana os 7º, 28º e 32º dias após a infecção.

- **INFECCÃO**

Os camundongos foram inoculados, por via intraperitoneal, com 50.000 formas tripomastigotas das cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*. O inóculo foi calculado de acordo com o método de (PIZZI & PRAGUER, 1952), modificado por (BRENER, 1961).

- **PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

1- Parasitemia

Foi avaliada pelo exame direto do sangue periférico ao microscópio, entre lamínula e lamínula 22 x 22 mm, em dias consecutivos a partir do 6º dia para cepa Y e 7º dia para cepa Colombiana até ocorrer ausência de parasitos circulantes ou óbito dos animais do experimento.

2- Taxa de Mortalidade

O índice de mortalidade foi avaliado durante todo o estudo pela porcentagem de animais mortos em relação ao número de animais sobreviventes, excluindo os animais sacrificados para o estudo histopatológico.

3- Eutanásia

Para cepa Y os animais foram eutanasiados no 7º e 12º dias pós-infecção e para cepa Colombiana no 7º, 28º e 32º dias para coleta de material para histopatologia. Para a realização da eutanásia, cada animal foi submetido ao aprofundamento de anestesia com (Acepran[®], por via intramuscular) e posteriormente realizado o procedimento de exsanguinação. Após esta etapa cada animal foi necropsiado para obtenção de amostras de músculo esquelético (isquiotibiais e tríceps sural) e miocárdio.

- **AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO LOCOMOTOR**

Teste do Campo Aberto (Open Field)

Os animais foram avaliados antes e durante o período de infecção até os dias de sacrifício pré-estabelecido para cada cepa. A avaliação foi realizada diariamente por um período de 2 minutos por animal, em uma caixa de acrílico medindo 45x60 cm com seu piso dividido em quadrados iguais medindo 15x15 cm por onde os animais se locomoviam livremente. Foram analisadas a quantidade de locomoção (número de quadrados percorridos), orientação vertical (quantidade do movimento exploratório de

apoio sobre as patas traseiras), número de episódios de ‘grooming’ (reações de auto-higienização), quantidade de bolos fecais e frequência de micção (WALSH & CUMMINS, 1976; BROWN et al., 1999; CARREY et al., 2000).

Método BMS

O método consiste na avaliação de atributos biomecânicos da marcha como movimento e alinhamento das patas, sustentação da cauda, estabilidade do tronco e coordenação. A avaliação foi realizada diariamente, durante um período de 4 minutos por animal, em uma plataforma de campo aberto, analisando-se as características da função locomotora dos camundongos de acordo com o escore e subescore estabelecidos pela Escala Basso para avaliação locomotora murina (‘Basso Mouse Scale’) ou BMS (BASSO et al., 2006). Os animais foram avaliados antes e durante o período de infecção até os dias de sacrifício pré-estabelecido para cada cepa.

Rota Rod

Os animais foram avaliados antes e durante o período de infecção até os dias de sacrifício pré-estabelecido para cada cepa. A coordenação/equilíbrio motor foi avaliada diariamente a partir da capacidade dos animais em permanecer em uma barra giratória horizontal, a uma velocidade de 5 rpm, por um período de 2 minutos, repetido por três vezes. A média das três repetições foi utilizada para análise estatística. Antes do início dos experimentos somente os animais capazes de permanecer por um período de 1 minuto, repetido por três vezes, foram selecionados para formação randômica dos grupos que participaram dos experimentos (UCHIHASHI et al., 1993; KO et al., 1999; KUMON et al., 2010).

• ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Microscopia de Luz

Os camundongos foram eutanasiados em número de 3 (três) por ponto de escolha. Secções do músculo esquelético (isquiotibiais e tríceps sural) e miocárdio foram coletadas e fixadas em formol a 10%. Os tecidos foram incluídos em parafina e obtidas

lâminas de 5 µm coradas por hematoxilina-eosina para estudo histopatológico (músculo esquelético e miocárdio). A presença de ninhos parasitários foi quantificada a partir da contagem de 100 campos, no aumento de 400x e a aquisição das imagens para construção das pranchas histológicas no aumento de 200x. Ambas as análises foram realizadas pelo microscópio Olympus BX51[®]

- **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos foram representados como a média ou mediana +/- desvio padrão e intervalo interquartil, respectivamente e analisados pelo pacote estatístico GraphPad PRISM 5.0 através do teste *t* de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney Wilcoxon para dados não-paramétricos. Foi admitido um nível de significância de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

✓ Cepa Y

• SOBREVIDA CUMULATIVA

A avaliação da sobrevida cumulativa entre os grupos durou até o 14º dia, período do experimento onde todos os animais do grupo infectado foram a óbito (Fig.1). O início deste processo se deu a partir do 12º dia de infecção com perda de três animais. No 13º dia de experimento não foi possível à continuação das avaliações de função motora devido ao óbito de seis animais, desta forma, inviabilizando análise estatística dos testes de função locomotora entre os grupos a partir deste dia.

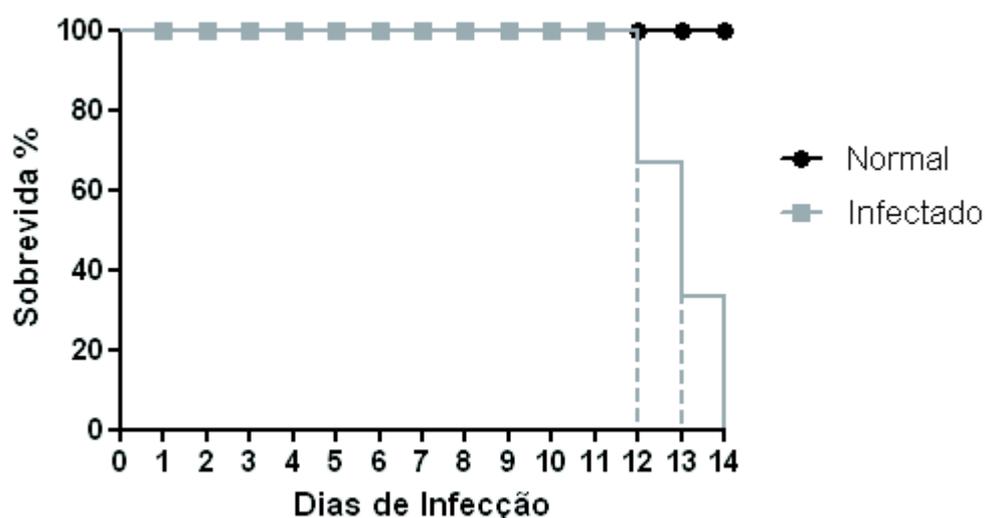


Figura 1. Gráfico de sobrevida dos animais (*Mus musculus*) durante o período do experimento realizado com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* na fase aguda. Óbito dos animais do grupo infectado nos dias 12 (3 animais), 13 (6 animais) e 14 (4 animais), n=13.

• PARASITEMIA

A avaliação da quantidade de parasitos circulantes no sangue foi iniciada a partir do 6º dia de infecção (Fig.2). No 11º dia pôde-se observar aumento considerável do número de parasitos, atingindo seu pico no 12º dia. A quantidade de tripomastigotas circulantes no sangue nos 13º e 14º dias mantiveram-se entre 90-100 no total de 50 campos analisados. A redução da parasitemia não foi observada devido ao óbito dos animais como observado no gráfico de sobrevivida.

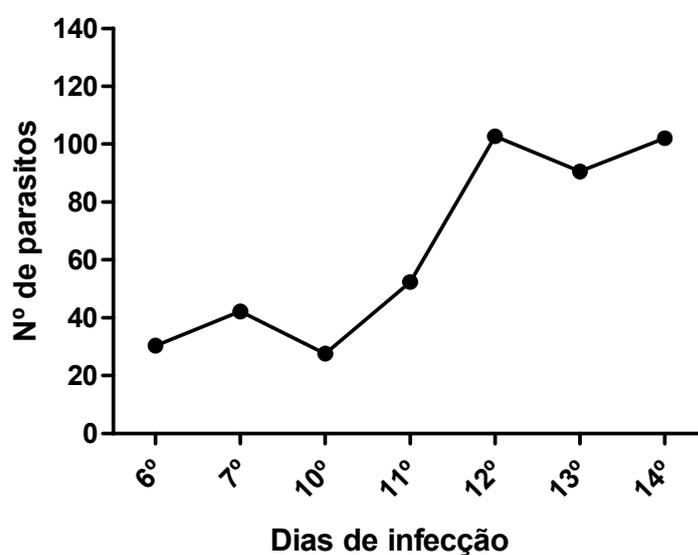


Figura 2. Gráfico representando a parasitemia em camundongos infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* por 14 dias em 50 campos analisados diariamente a partir do 6º dia de infecção, n=3 animais/dia.

• NINHOS DE AMASTIGOTAS

A presença de ninhos de amastigotas no coração, isquiotibiais e tríceps sural foram analisados durante o 7º e 12º dpi (Tabela.1). Na primeira semana, apenas raros ninhos foram encontrados nos músculos isquiotibiais, porém, sem significância estatística comparada ao coração e tríceps sural. No 12º dia, alto parasitismo foi encontrado em todos os tecidos analisados com aumento significativo quando comparado ao 7º dpi. Nos músculos isquiotibiais, foi observada a maior quantidade de ninhos entre os tecidos avaliados no 12º dpi com diferença significativa quando comparado ao tecido muscular cardíaco.

Tabela 1. Quantidade de ninhos de amastigotas no músculo esquelético e cardíaco infectados pela cepa Y.

MÚSCULOS	DIAS PÓS - INFECÇÃO	
	7	12
Coração	0,0 ± 0,0	31,7 ± 7,9 ^{a,b}
Isquiotibiais	0,6 ± 1,8	72,8 ± 23,7 ^{a,b}
Tríceps sural	0,0 ± 0,0	35,1 ± 13,6 ^b

^a: diferença na coluna ($p < 0,05$); ^b: diferença com os valores do 7º dpi ($p < 0,05$).

- **AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE QUADRADOS PERCORRIDOS - TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)**

A mensuração da quantidade de quadrados percorridos durante o teste do campo aberto ('Open Field') foi o parâmetro da função locomotora mais sensível para demonstrar os efeitos da fase aguda da infecção chagásica experimental com a cepa Y sobre o desempenho locomotor do grupo infectado (Fig.3). A partir do 7º dia de infecção houve redução significativa dos quadrados percorridos entre os grupos de acordo com o teste t de Student, $P \leq 0,05$. A quantidade de deslocamento no campo aberto reduziu progressivamente até o 12º dia, etapa caracterizada por alta mortalidade, pico parasitêmico, maior quantidade de ninhos de amastigotas e piora no estado geral dos animais.

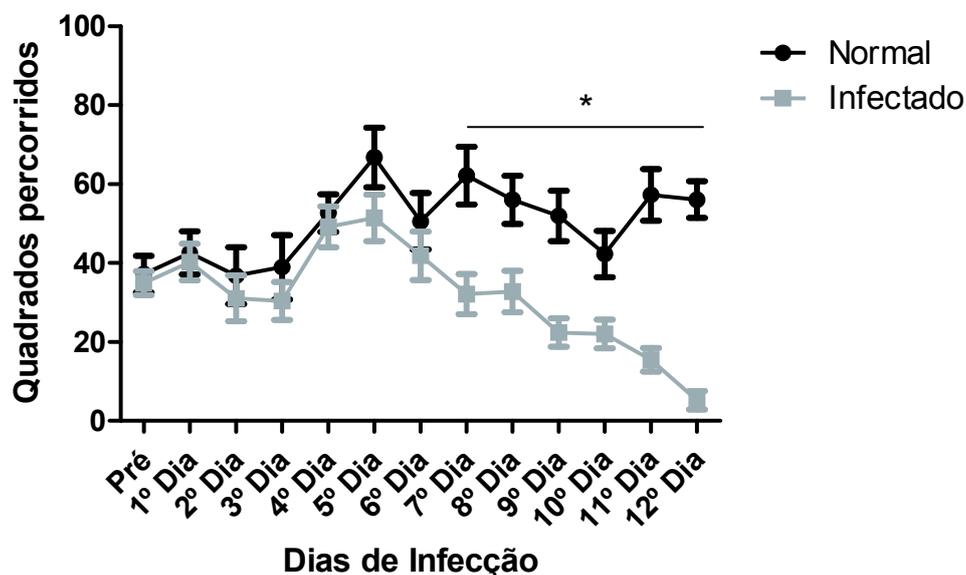


Figura 3. Mensuração da capacidade locomotora pela quantificação de quadrados percorridos entre o grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) durante avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

- **AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE EVENTOS DE ORIENTAÇÃO VERTICAL - TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)**

Desde o 7º dia de infecção pode-se notar uma diferença entre os grupos no gráfico (Fig.4), porém, somente a partir do 9º dia esta diferença tornou-se significativa de acordo com o teste t de Student, $P \leq 0,05$. Neste período os animais do grupo infectado demonstraram uma menor capacidade de explorar o ambiente, caracterizado por uma menor quantidade de apoio sobre as patas posteriores posicionando o corpo no sentido vertical durante o teste do campo aberto.

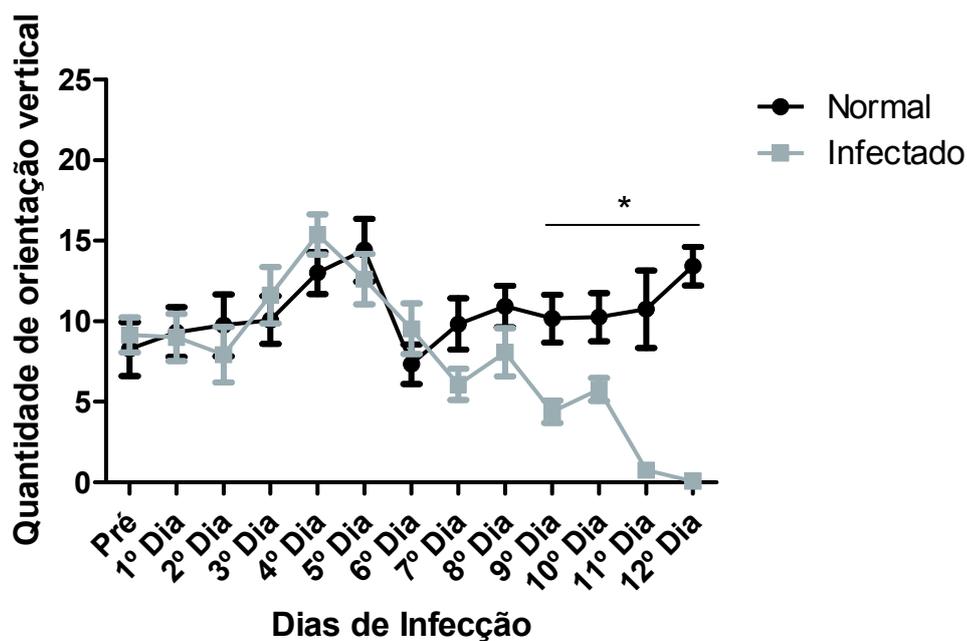


Figura 4. Frequência de eventos de apoio nas patas posteriores entre o grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) durante avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

- **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA MARCHA - MÉTODO BMS**

A qualidade da locomoção dos animais foi avaliada de acordo com o escore proposto pela escala de Basso (BMS), e, pôde-se observar que os grupos mantiveram a qualidade da marcha normal, representado por nove pontos no escore, até o 8º dia de avaliação (Fig.5). Decorrido esse período, o grupo infectado apresentou menores pontuações no escore com declínio significativo da qualidade da marcha de acordo com teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$. Do 9º ao 11º dia os animais apresentaram uma mediana de 8 pontos, caracterizada pela perda da capacidade de sustentação da cauda e, com leve instabilidade de tronco. No último dia de avaliação, além do comprometimento da cauda, notou-se a grave instabilidade de tronco, representada pela pontuação 7 no escore.

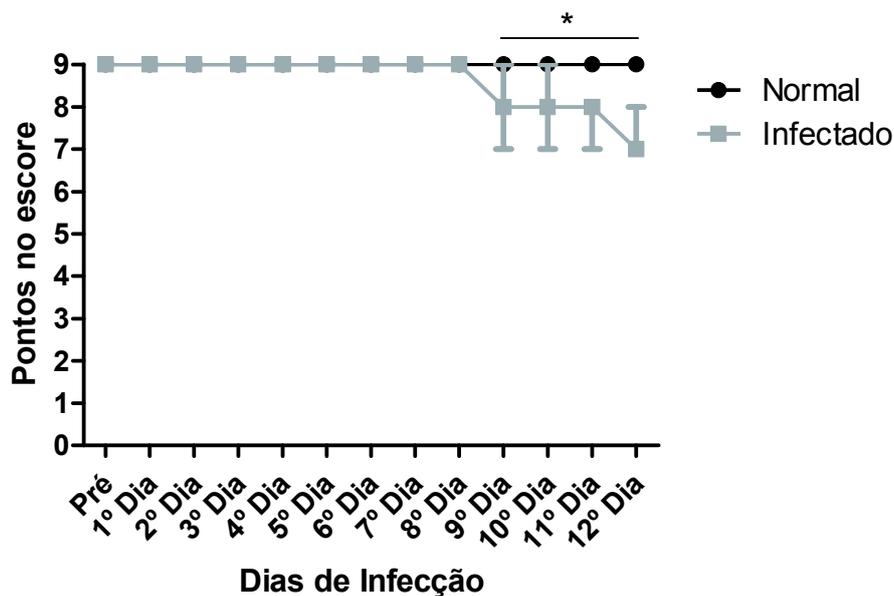


Figura 5. Quantidade de pontos obtidos pelo grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) no escore após análise pela BMS, n=13. Valores expressos em mediana (teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$).

- **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA MARCHA - MÉTODO BMS**

Os componentes que possibilitam uma locomoção quadrúpede normal foram avaliados de acordo com o subescore proposto pela escala BMS (Fig.6). Pode-se observar que como no escore, o subescore dos animais controle se manteve com a pontuação máxima (11 pontos), porém, nos animais infectados, a partir do 9º dia houve uma queda para 10 pontos (representado pela incapacidade de sustentação a cauda), durante o 10º e o 11º dia observa-se um platô de pontuação nove devido à instabilidade de tronco leve associada à incapacidade de sustentar a cauda. No último dia de análise, foi observada a menor pontuação durante o período do experimento, caracterizada por incapacidade de sustentação do quarto posterior (região dos membros posteriores e pelve próxima da base da cauda) e perda da capacidade em manter o calcanhar, joelho e base da cauda acima do solo durante a marcha, definida como instabilidade de tronco grave, que impossibilita o deslocamento normal dos animais. Do 9º ao 12º dias a diferença entre os grupos foi significativa de acordo com teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$.

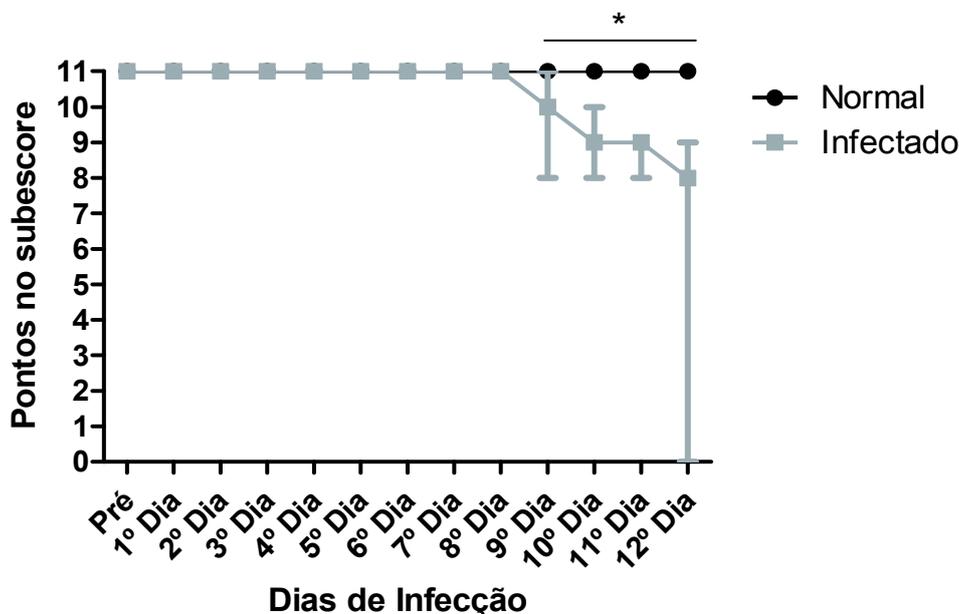


Figura 6. Quantidade de pontos obtidos pelo grupo infectado pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) no subescore após análise pela BMS, n=13. Valores expressos em mediana (teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$).

• COORDENAÇÃO/EQUILÍBRIO MOTOR – ROTA-ROD

O grupo infectado apresentou dificuldade para manter a coordenação e o equilíbrio na barra giratória do *Rota-Rod* nos dois últimos dias de avaliação (Fig.7). Pode-se observar que até o 10º dia de experimento não houve alteração do parâmetro supracitado entre os grupos. Somente no 11º e 12º dias, os animais do grupo experimental apresentaram diminuição significativa do tempo de permanência na barra giratória quando comparado ao grupo normal de acordo com teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,05$. No último dia de avaliação, os animais infectados perderam a capacidade de se manter na barra giratória, provavelmente devido ao comprometimento da postura dinâmica na metade posterior do corpo (instabilidade de tronco grave associada à perda do controle da cauda descrito pela BMS).

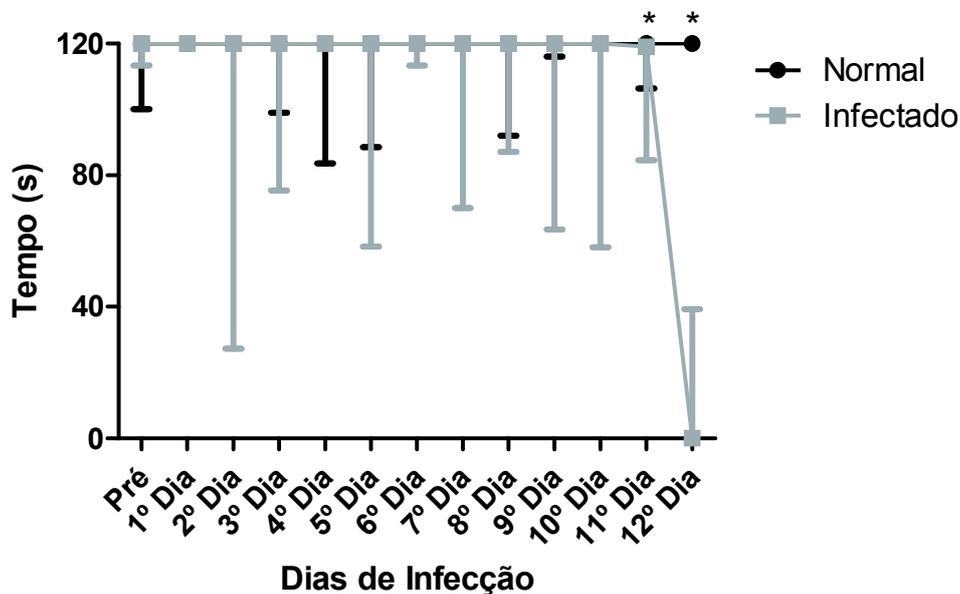


Figura 7. Tempo, em segundos, do grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) submetidos à avaliação pelo Rota-Rod, n=13. Valores expressos em mediana (teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,05$).

• EVENTOS DE ‘GROOMING’

Durante o teste do campo aberto os grupos apresentaram aumento na frequência de eventos de reações de auto-higiene durante a primeira semana de avaliação (Fig.8). Na segunda semana, este padrão oscilou entre menor (8º dia) e maior (9º dia) número de episódios nos dois grupos. Apenas no 12º dia houve diferença significativa de acordo com o teste t de Student, * $P \leq 0,05$.

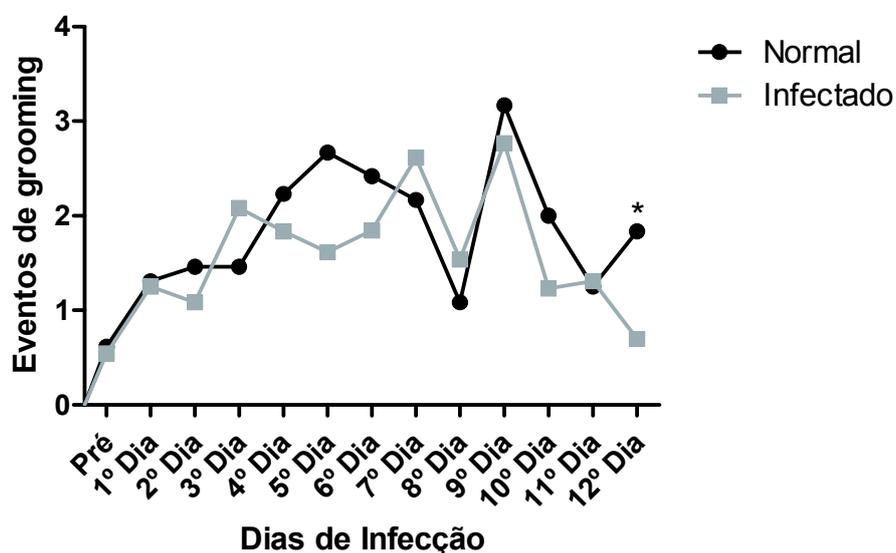


Figura 8. Quantidade de eventos de ‘grooming’ comparando o grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) durante o teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

• FREQUÊNCIA DE EVACUAÇÕES

Variações significativas na quantidade de bolos fecais presente sobre a plataforma do campo aberto durante os dois minutos de avaliação da função locomotora entre os dois grupos foi observado no 1º, 6º e 11º dias após a infecção, de acordo com o teste t de Student, * $P \leq 0,05$ (Fig.9). Em todos os dias citados o grupo normal apresentou maior frequência de evacuações.

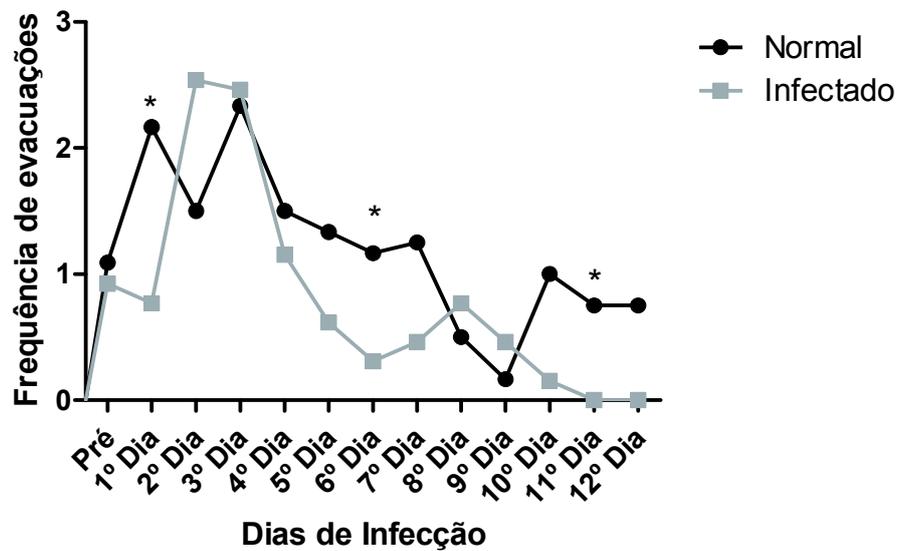


Figura 9. Quantidade de bolos fecais do grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) após avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

• FREQUÊNCIA DE MICTURIÇÃO

Durante o período do experimento houve diferença significativa na frequência de micturição de urina sobre a plataforma do campo do aberto apenas no segundo dia de experimentos de acordo com o teste *t* de Student, * $P \leq 0,05$ (Fig.10). Neste dia, foi detectado maior frequência no grupo de animais infectados.

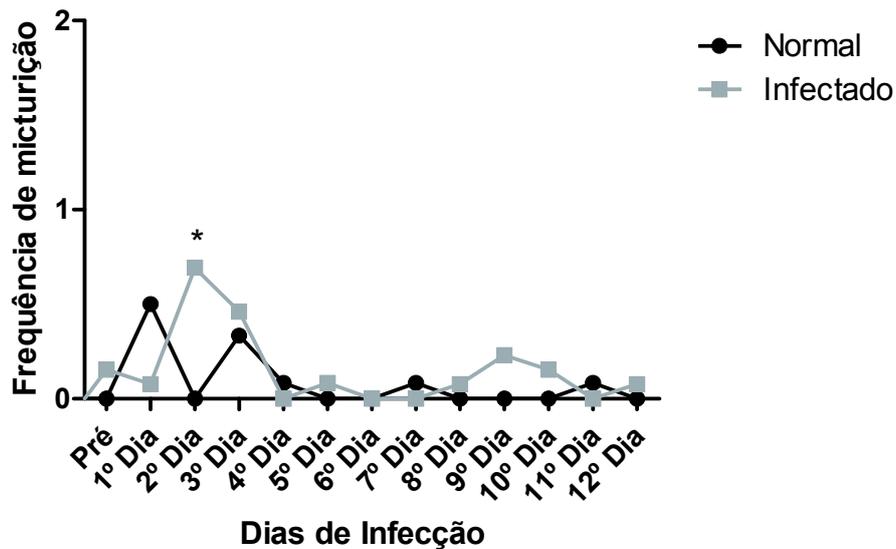


Figura 10. Quantificação da frequência de micturição no campo aberto comparando grupo infectado com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) após avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste *t* de Student, * $P \leq 0,05$).

- **ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

Os animais infectados pela cepa Y foram eutanasiados no 7º e 12º dpi. Na primeira semana, sinais de inflamação e parasitismo tecidual foram escassos, os animais apresentaram raros e discretos focos inflamatórios no miocárdio, assim como alterações focais nos músculos isquiotibiais representadas por infiltrado inflamatório intersticial, leve infiltrado perivascular mononuclear e ninhos de amastigotas sem reação inflamatória. Porém, não foram observadas mudanças no músculo tríceps sural neste período. No 12º dpi. o tecido cardíaco apresentou numerosos ninhos de pequeno tamanho, sem reação inflamatória. Mudanças mais acentuadas puderam ser observadas no músculo esquelético. Nos isquiotibiais houve grande presença de amastigotas intra e extracelular associado à ruptura de fibras musculares e no músculo tríceps sural grandes ninhos de amastigotas ao longo das fibras musculares e tecido fibroadiposo intersticial foi encontrado. Desta forma, a gravidade das alterações esteve associada com a evolução da infecção.

- ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS 7º DPI

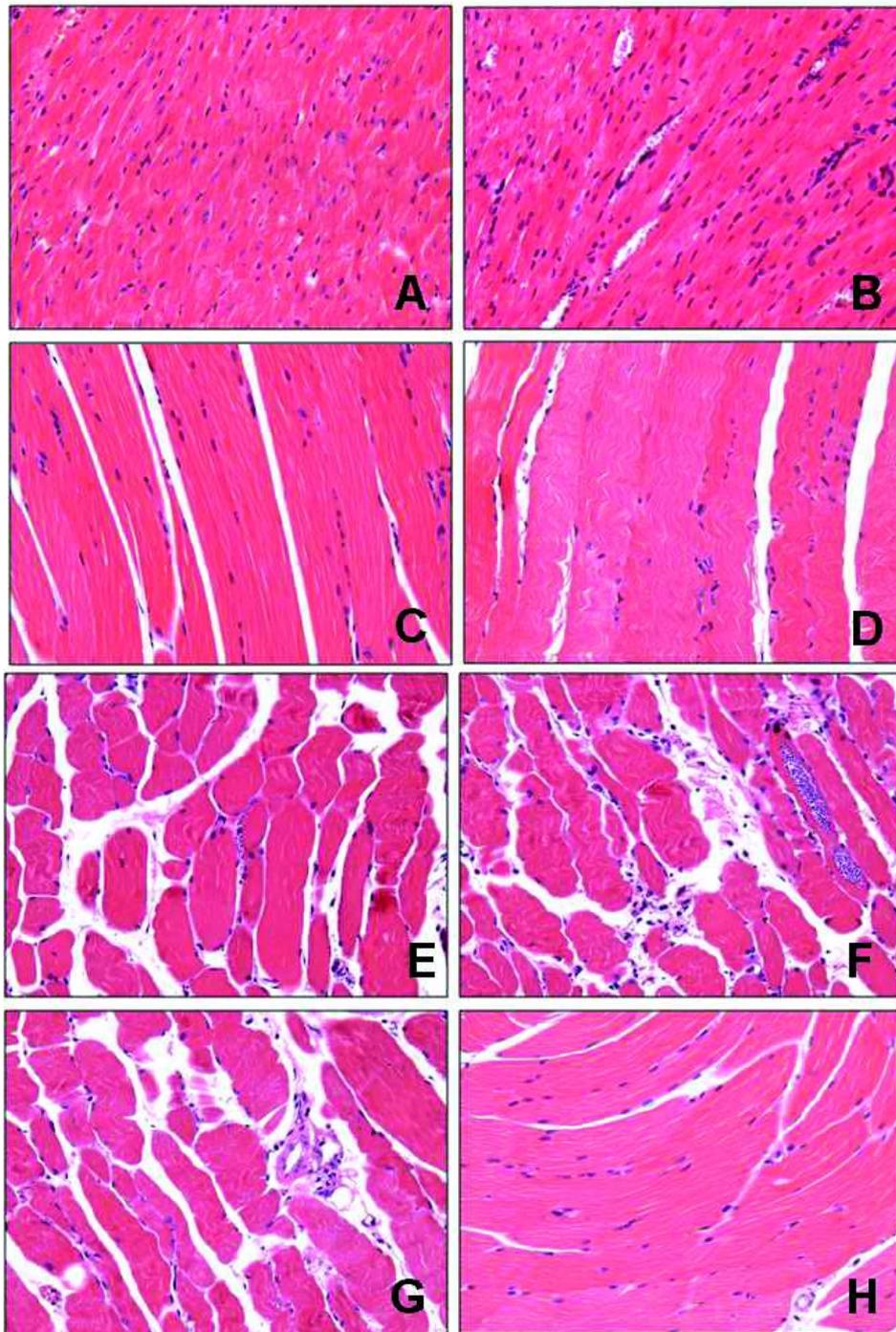


Figura 11. Histologia representativa do miocárdio e músculo esquelético do grupo controle (A, C, D) e infectado pela cepa Y do *T. cruzi* (B, E, F, G, H) no 7º dpi. A: miocárdio do grupo controle. B: miocárdio com raros e discretos focos inflamatórios. C, D: músculo esquelético (isquiotibiais e tríceps sural, respectivamente) do grupo controle apresentando características normais. E, F, G: alterações focais nos músculos isquiotibiais representadas por infiltrado inflamatório intersticial, leve infiltrado perivascular mononuclear e ninhos de amastigotas sem reação inflamatória. H: Os animais infectados não apresentaram alterações histopatológicas no músculo tríceps sural. H & E 200X.

• ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS 12º DPI

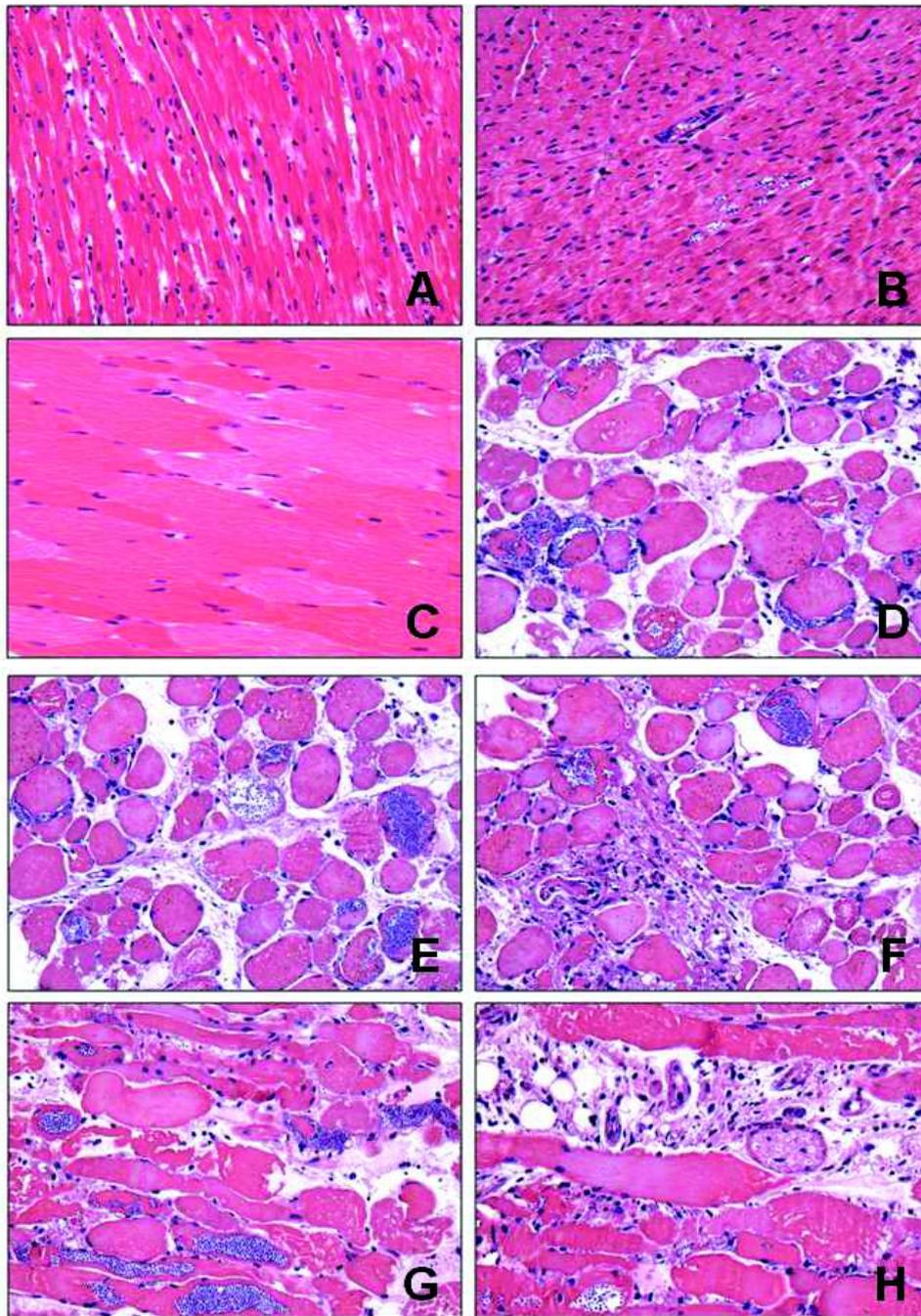


Figura 12. Histologia representativa do miocárdio e músculo esquelético do grupo controle (A, C) e infectado pela cepa Y do *T. cruzi* (B, D, E, F, G, H) no 12º dpi. A: miocárdio do grupo controle. B: presença de numerosos ninhos de pequeno tamanho sem reação inflamatória no miocárdio. C: músculo esquelético do grupo controle apresentando características normais. D, E, F: coleção de amastigotas intra e extracelular, presença de ninhos parasitários com ruptura de fibras musculares (isquiotibial). G, H: músculo tríceps sural apresentando grandes ninhos de amastigotas ao longo das fibras musculares e tecido adiposo associado ao tecido fibroso no interstício. H & E 200X.

✓ Cepa Colombiana

- SOBREVIDA CUMULATIVA

A taxa de sobrevivência cumulativa manteve-se inalterada durante todo o período de análise (Fig. 13). Neste experimento, a sobrevivência dos animais do grupo infectado pela cepa Colombiana não foi o principal determinante para conclusão da avaliação locomotora.

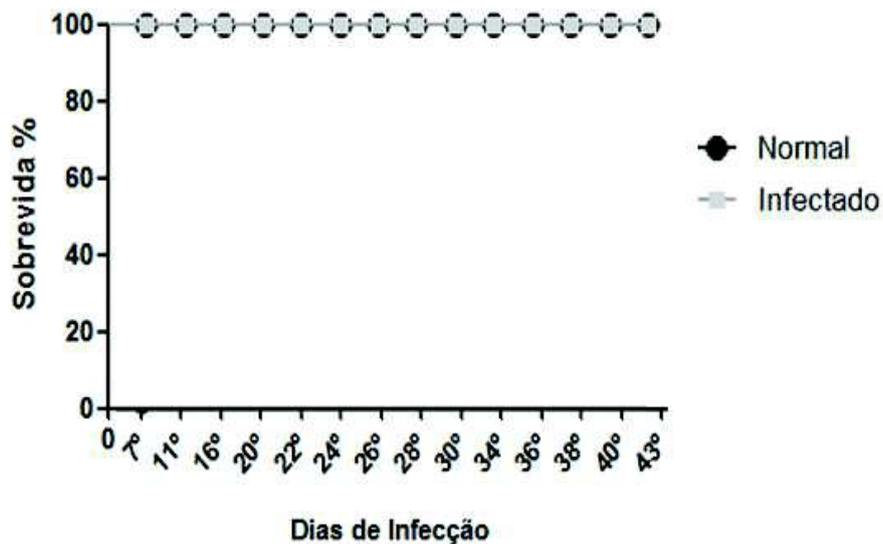


Figura 13. Gráfico de sobrevivência dos animais (*Mus musculus*) durante o período do experimento realizado com a cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* na fase aguda. Os animais do grupo infectado não foram a óbito. N=13.

• PARASITEMIA

O aumento da quantidade de parasitos circulantes no sangue ocorreu a partir do 11º dia de infecção com rápida elevação entre o 18º e 24º dia e apresentando seu pico no 26º dia (Fig.14). A redução da parasitemia ocorreu gradativamente até o 43º dia sendo observado novo pico parasitêmico no 34º dia pós-infecção.

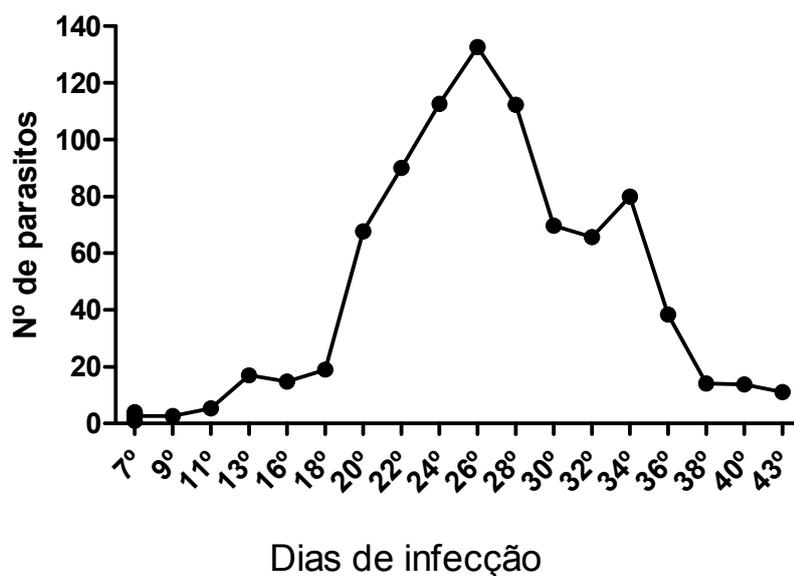


Figura 14. Gráfico representando a parasitemia em camundongos infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* por 43 dias em 50 campos analisados diariamente a partir do 7º dia de infecção, n=3 animais/dia.

- **NINHOS DE AMASTIGOTAS**

A presença de ninhos de amastigotas no coração, isquiotibiais e tríceps sural foi analisada durante o 7º, 26º e 32º dpi (Tabela.2). Durante a primeira semana a presença de ninhos parasitários não foi observada. No 26º dia o músculo tríceps sural apresentou maior presença de ninhos de amastigotas quando comparado ao coração e isquiotibiais. Neste dia foi observado o maior grau de parasitismo dos três tecidos avaliados com diferença significativa entre os dias analisados. No 32º dia houve redução significativa da presença dos ninhos no músculo esquelético e cardíaco comparado ao 26º dpi. O músculo tríceps sural apresentou menor parasitismo nesta fase.

Tabela 2. Quantidade de ninhos de amastigotas no músculo esquelético e cardíaco infectados pela cepa Colombiana.

MÚSCULOS	DIAS PÓS - INFECÇÃO		
	7	26	32
Coração	0,0 ± 0,0	9,8 ± 2,7 ^a	0,8 ± 0,4 ^{c,e}
Isquiotibiais	0,0 ± 0,0	6,0 ± 2,5 ^b	1,8 ± 0,8 ^{d,e}
Tríceps sural	0,0 ± 0,0	11,75 ± 1,2 ^{a,b}	0,3 ± 0,2 ^{c,d,e}

^a: diferença na coluna-26º dpi ($p < 0,05$); ^b: diferença na coluna-26º dpi ($p < 0,05$);

^c: diferença na coluna-32º dpi ($p < 0,05$); ^d: diferença na coluna-32º dpi ($p < 0,05$);

^e: diferença com os valores do 26º dpi ($p < 0,05$).

- **AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE LOCOMOÇÃO - TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)**

A quantidade de locomoção foi o parâmetro mais sensível á fase aguda da infecção para chagásica experimental pela a cepa Colombiana sobre o desempenho locomotor do grupo infectado. Desde a primeira semana de avaliação o grupo infectado apresentou redução significativa na quantidade de quadrados percorridos no 2º e 5º dia de infecção (Fig.15). A partir do 7º dia a redução da quantidade de locomoção dos animais infectados manteve-se significativa até o 43º dia de avaliação de acordo com o teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

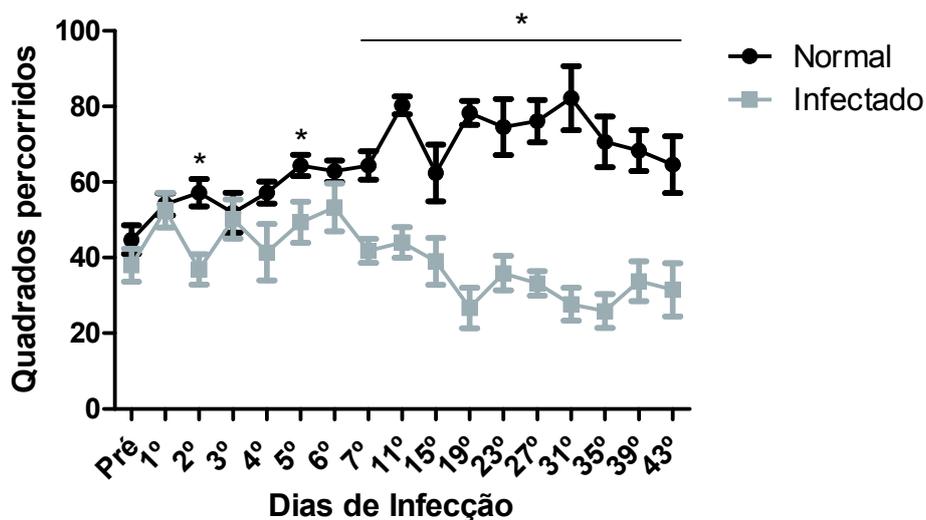


Figura 15. Mensuração da capacidade locomotora pela quantificação de quadrados percorridos entre o grupo infectado com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) durante avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

- **AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE EVENTOS DE ORIENTAÇÃO VERTICAL - TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)**

A comparação entre os grupos demonstrou diferença desde a primeira semana de avaliação (Fig.16). Após o 10º dia de infecção houve diferença significativa quanto à capacidade do grupo infectado de orientar verticalmente o corpo em apoio nas patas posteriores até o penúltimo dia de avaliação de acordo com o teste t de Student, * $P \leq 0,05$.

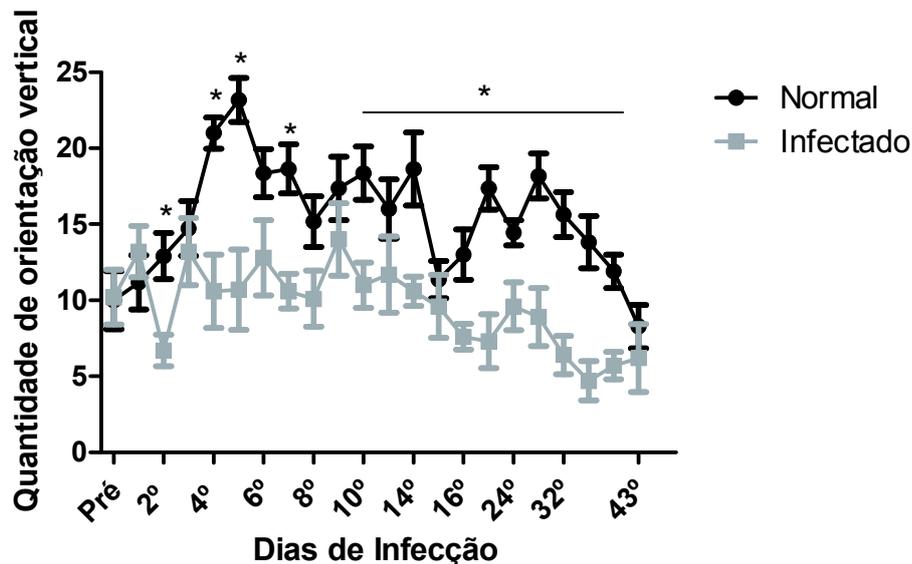


Figura 16. Frequência de eventos de apoio nas patas posteriores entre o grupo infectado com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) durante avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

- **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA MARCHA - MÉTODO BMS**

O aspecto geral da locomoção da marcha dos animais foi avaliado de acordo com o escore proposto pela escala de Basso para camundongos (*Basso Mouse Scale – BMS*), e, pôde-se observar que os grupos mantiveram a qualidade da marcha normal, representado por nove pontos no escore, até o 21º dia de avaliação (Fig.17). Decorrido esse período, o grupo infectado apresentou declínio significativo da qualidade da marcha representado pela pontuação oito no escore de acordo com o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$. Esta condição foi caracterizada pela incapacidade de sustentação da cauda e/ou leve instabilidade de tronco e se manteve até o 43º dia de infecção.

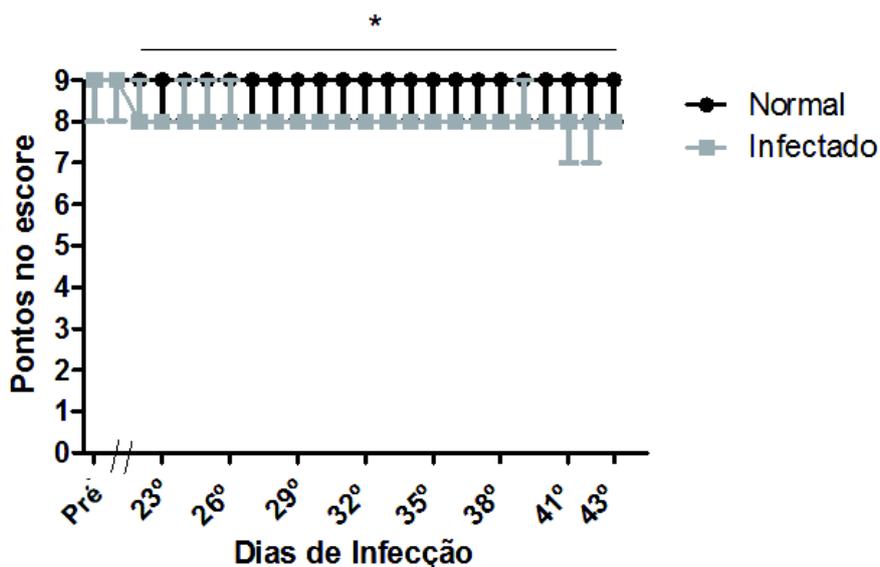


Figura 17. Quantidade de pontos obtidos pelo grupo infectado com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) no escore após análise pela BMS, n=13. Valores expressos em mediana (teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$).

- **AValiação da Qualidade da Marcha - Método BMS**

Os detalhes finos da qualidade da marcha, componentes que possibilitam uma locomoção quadrúpede normal, foram avaliados de acordo com o subescore proposto pela escala BMS. O subescore dos animais infectados se manteve com a pontuação máxima (11 pontos) até o 20º dia de avaliação, no 21º dia houve uma queda para 10 pontos (representado pela incapacidade de sustentar a cauda) e a partir do 23º dia observa-se redução do subescore para 9 pontos (devido à instabilidade de tronco leve associado a incapacidade de sustentar a cauda) que se mantém até o último dia de avaliação exceto no 40º dia onde houve elevação pontual do subescore para 10 pontos de acordo com o teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$ (Fig.18).

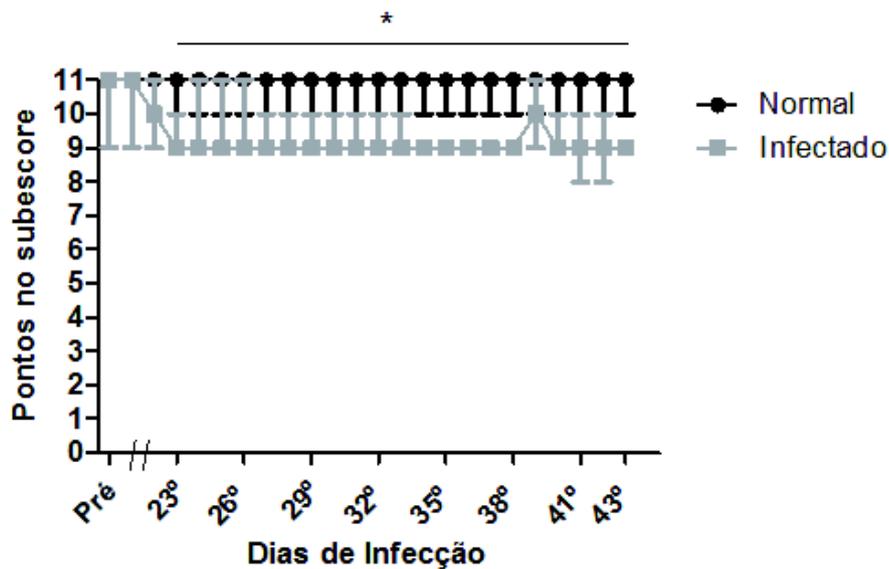


Figura 18. Quantidade de pontos obtidos pelo grupo infectado pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) no subescore após análise pela BMS, n=13. Valores expressos em mediana (teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, * $P \leq 0,001$).

• COORDENAÇÃO/EQUILÍBRIO MOTOR – ROTA-ROD

A avaliação da coordenação e equilíbrio dinâmico na barra giratória do *Rota-Rod* não apresentou diferença entre os grupos durante o curso do experimento. Os animais do grupo infectado seguiram o mesmo padrão do grupo normal mantendo o tempo máximo de permanência no equipamento durante os 43 dias de infecção (Fig.19). Desta forma, demonstrando que a avaliação pela barra giratória a 5 rpm não foi capaz de detectar diferença entre os grupo ao longo da infecção.

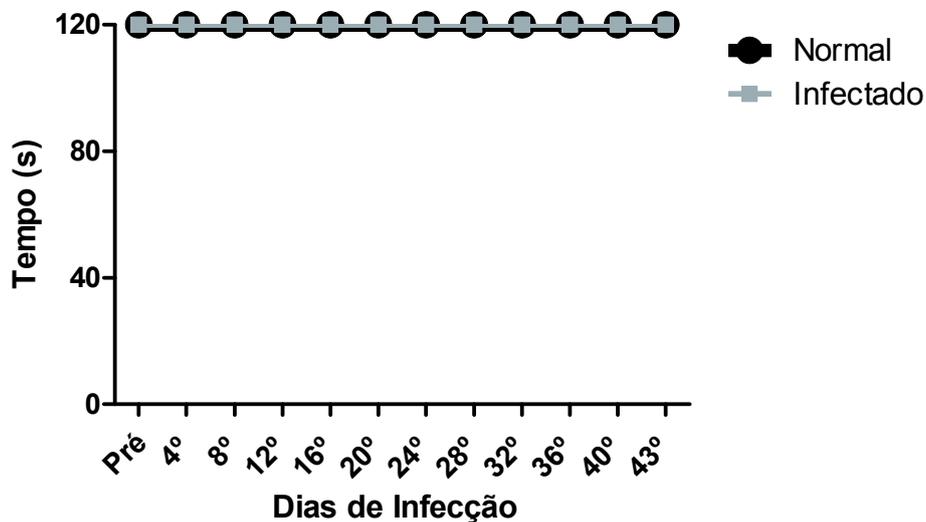


Figura 19. Tempo, em segundos, do grupo infectado com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) submetidos à avaliação pelo *Rota-Rod*, n=13. Valores expressos em mediana (teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, não houve diferença estatística).

- **EVENTOS DE ‘GROOMING’**

Durante o teste do campo aberto os grupos apresentaram oscilação na quantidade de eventos de reações de auto-higiene durante os 43 dias de avaliação (Fig.20). Apenas no 7º e 19º dia o grupo infectado apresentou mais episódios de ‘grooming’ e o grupo controle no 32º e 43º dia pós-infecção de acordo com o teste t de Student, * $P \leq 0,05$.

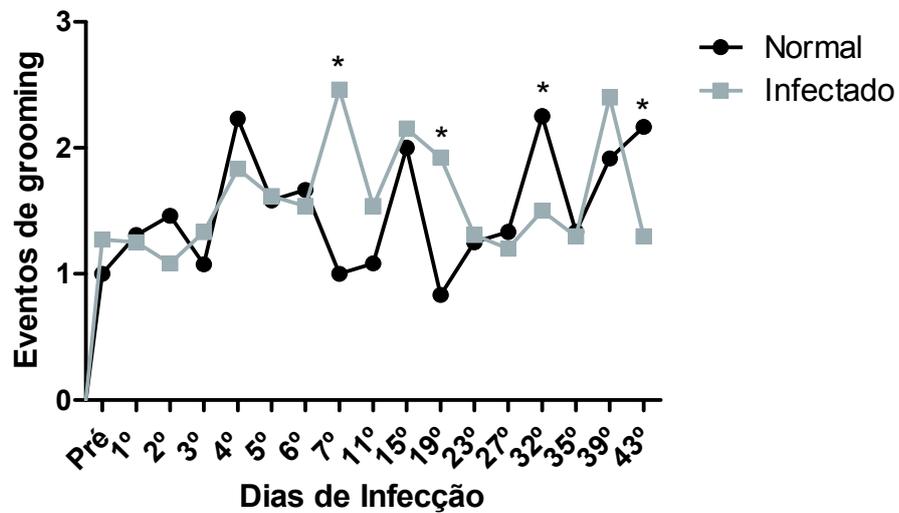


Figura 20. Quantidade de eventos de ‘grooming’ comparando o grupo infectado com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) durante o teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

• FREQUÊNCIA DE EVACUAÇÕES

O grupo não infectado apresentou variações significativas na quantidade de bolos fecais sobre a plataforma do campo aberto durante os dois minutos de avaliação da função locomotora entre os grupos no 5º e 19º dias após a infecção de acordo com o teste t de Student, * $P \leq 0,05$ (Fig.21).

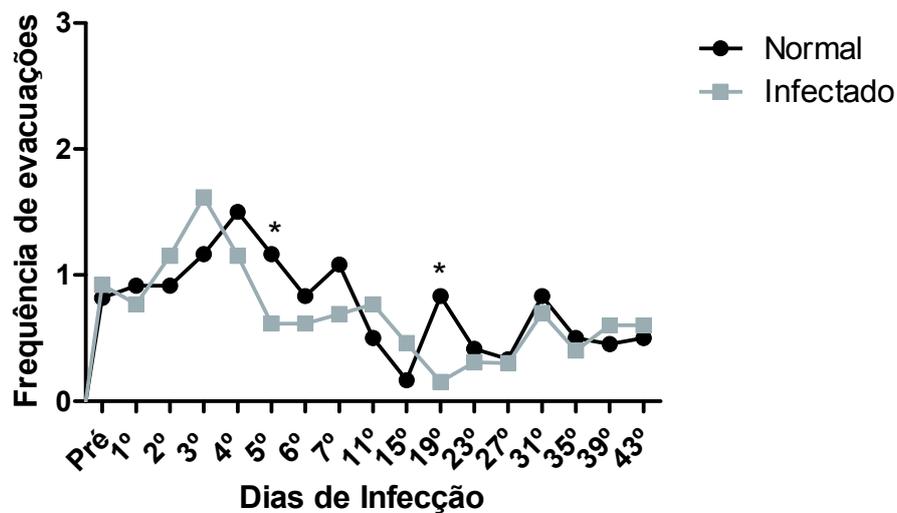


Figura 21. Quantidade de bolos fecais do grupo infectado com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) após avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

• FREQUÊNCIA DE MICTURIÇÃO

Durante o período do experimento houve diferença significativa na frequência de micturição sobre a plataforma do campo aberto apenas no quinto dia após a infecção (Fig.22). Neste dia, o grupo infectado apresentou maior frequência comparado ao grupo normal de acordo com o teste t de Student, * $P \leq 0,05$.

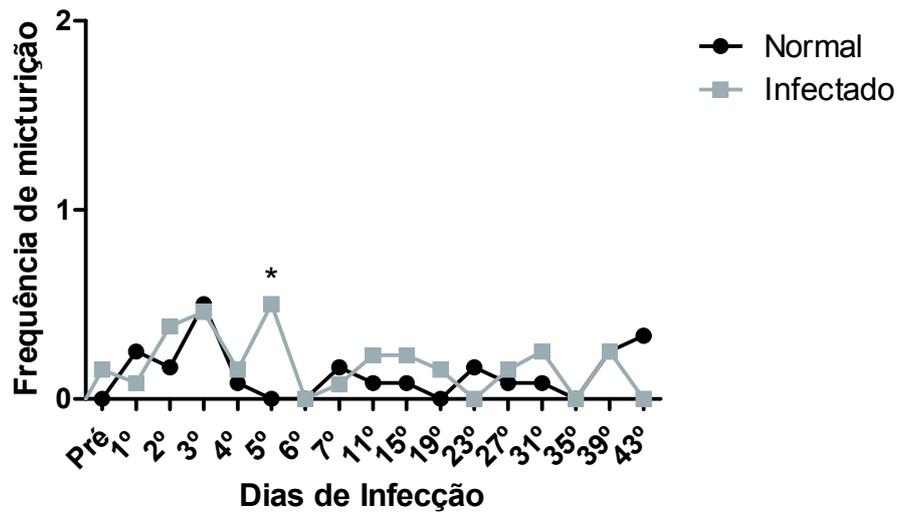


Figura 22. Quantificação da frequência de micturição no campo aberto comparando grupo infectado com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e o grupo controle (sem infecção) após avaliação no teste do campo aberto, n=13. Valores expressos em média (teste t de Student, * $P \leq 0,05$).

- **ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS**

Os animais infectados pela cepa Colombiana foram eutanasiados no 7º, 26º e 32º dpi. Durante a primeira semana, não houve presença inflamação ou parasitismo tecidual no miocárdio e tríceps sural, entretanto, lesões inflamatórias focais, sinais de centralização nuclear e infiltrado perivascular e intersticial leve foi observado em fibras musculares dos isquiotibiais. No 26º dia o tecido muscular cardíaco apresentou infiltrado inflamatório difuso com sinais de necrose focal e presença de ninhos parasitários. O músculo esquelético apresentou intenso infiltrado inflamatório, centralização nuclear, ninhos parasitários e degeneração focal de algumas fibras. Infiltrado mononuclear difuso e focal foi observado no tecido muscular cardíaco com 32 dias de infecção. Neste período, o músculo esquelético apresentou infiltrado inflamatório intenso e difuso, centralização nuclear, substituição de fibras musculares por tecido adiposo e fibroso e raros ninhos de amastigotas. Os animais infectados apresentaram evolução progressiva das alterações morfológicas descritas com maior comprometimento do músculo esquelético.

- ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS 7ºDPI

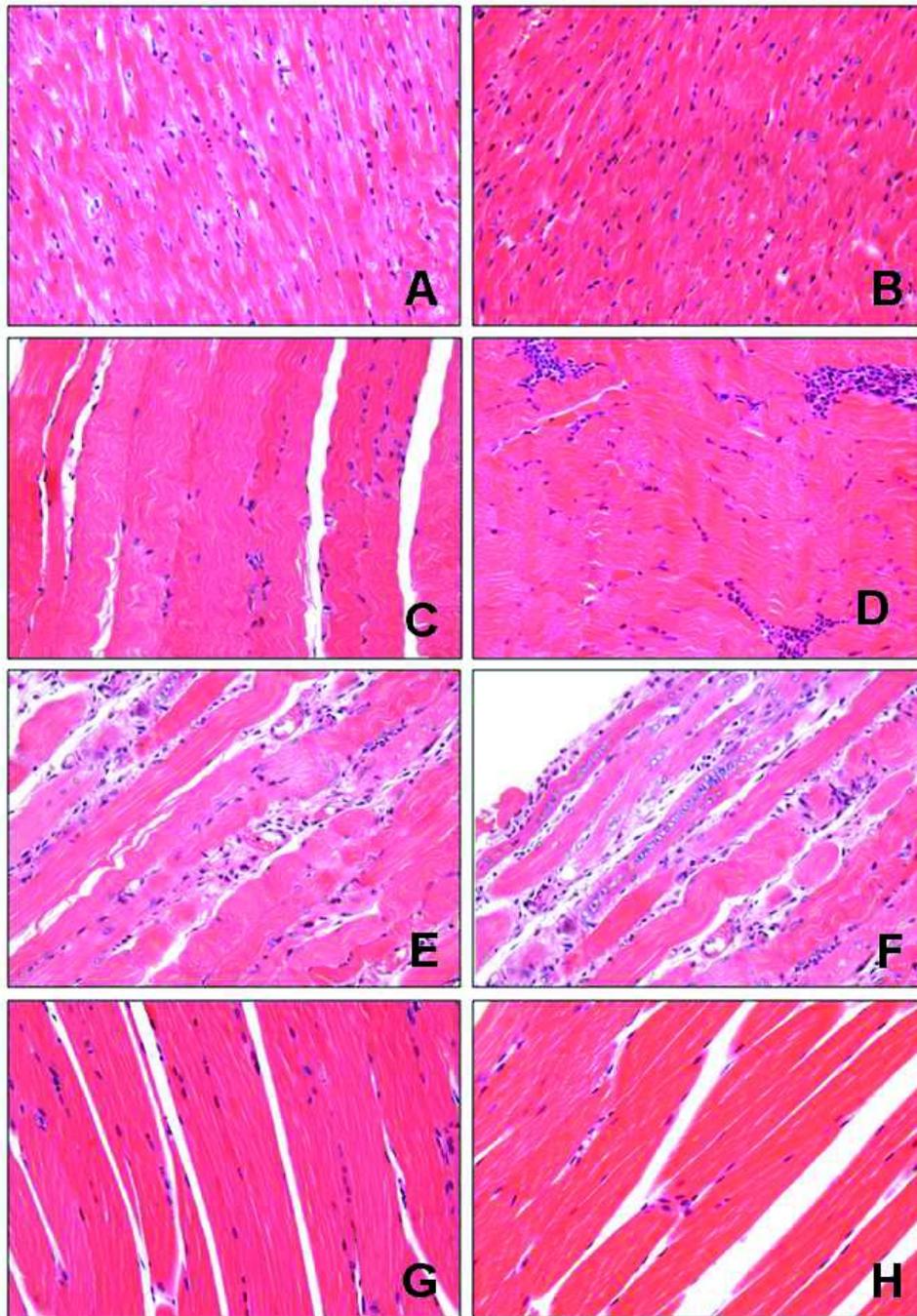


Figura 23. Histologia representativa do miocárdio e músculo esquelético do grupo controle (A, C, G) e infectado pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (B, D, E, F, H) no 7º dpi. A: miocárdio do grupo controle. B: não foi observado foco inflamatório ou ninhos parasitários no miocárdio do grupo infectado pela cepa Colombiana. C: músculo esquelético (isquiotibiais) do grupo controle apresentando características normais. D, E, F: lesões inflamatórias focais sem a presença de ninhos, infiltrado perivascular e intersticial leve, presença de centralização nuclear em algumas fibras musculares nos isquiotibiais. G, H: músculo tríceps sural apresentando características normais no grupo controle e cepa Colombiana respectivamente. H & E 200X.

- ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS 26°DPI

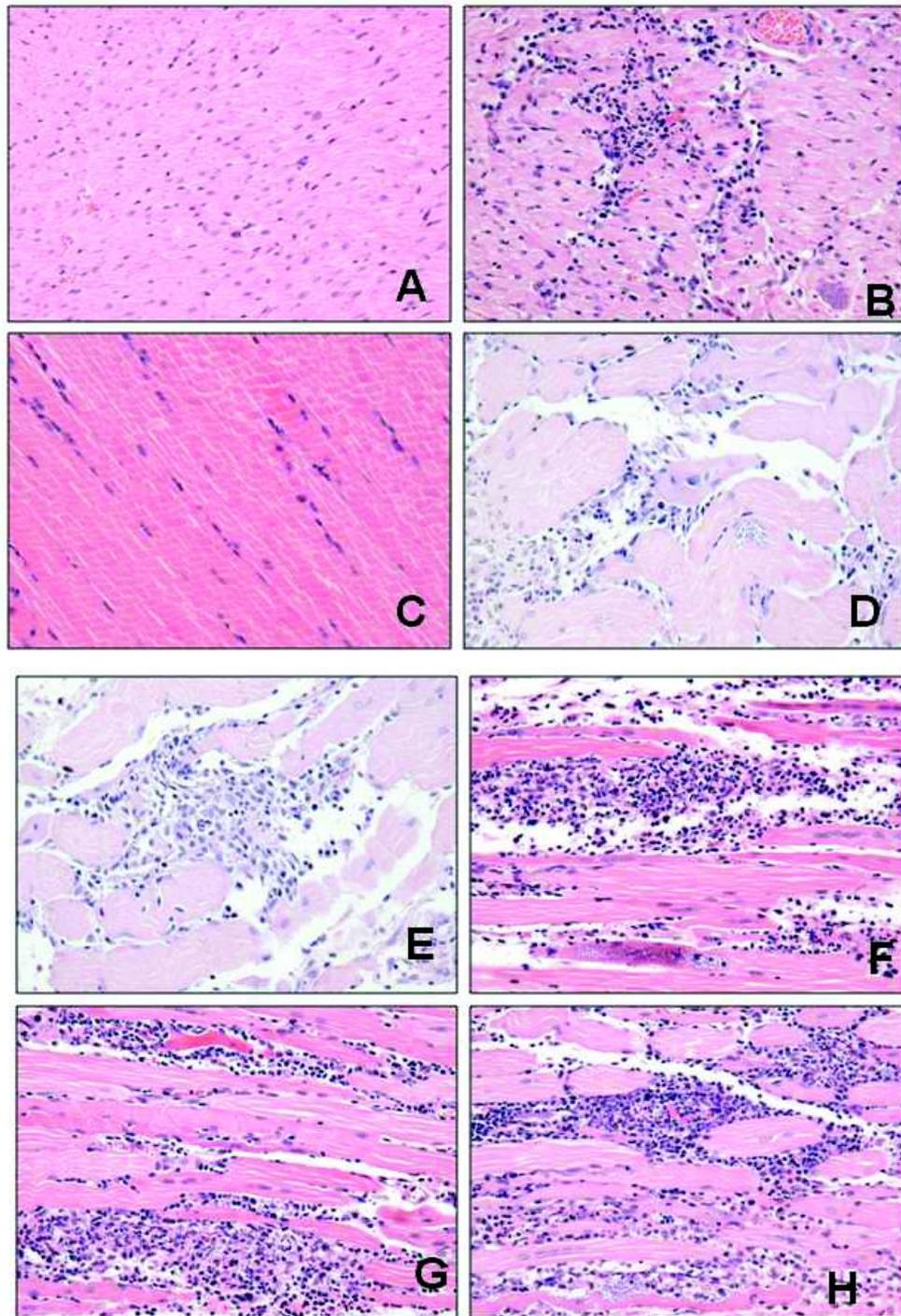


Figura 24. Histologia representativa do miocárdio e músculo esquelético do grupo controle (A, C) e infectado pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (B, D, E, F, G, H) no 26° dpi. A: miocárdio do grupo controle. B: miocárdio com infiltrado inflamatório difuso apresentando área de necrose focal e presença de ninho parasitário. C: músculo esquelético do grupo controle apresentando características normais. D, E: músculos isquiotibiais apresentando infiltrado focal e intenso, centralização nuclear, ninhos parasitários e substituição do miócito por tecido inflamatório. F, G, H: intenso infiltrado mononuclear, presença de ninhos de amastigotas, centralização nuclear e degeneração de fibras musculares no músculo tríceps sural. H & E 200X.

- ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS 32°DPI

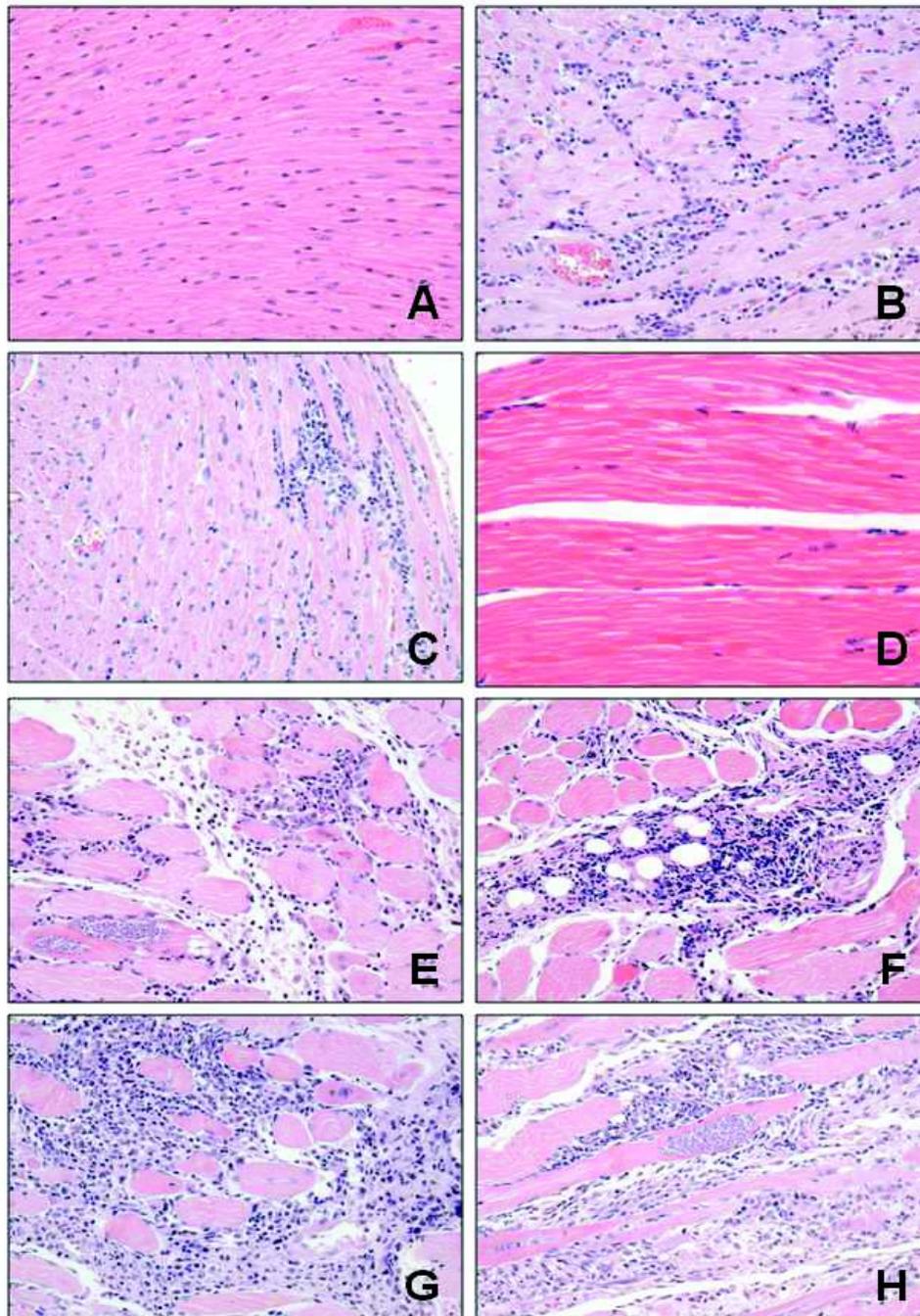


Figura 25. Histologia representativa do miocárdio e músculo esquelético do grupo controle (A, D) e infectado pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (B, C, D, E, F, G, H) no 32° dpi. A: miocárdio do grupo controle. B, C: miocárdio com infiltrado mononuclear difuso e focal. D: músculo esquelético do grupo controle apresentando características normais. E, F: intenso infiltrado mononuclear intersticial, substituição de fibras musculares por tecido adiposo e fibroso, miofibras apresentando centralização nuclear e raros ninhos de amastigotas nos isquiotibiais. G, H: músculo tríceps sural apresentando intenso infiltrado, centralização nuclear e apesar da presença de poucos amastigotas na análise quantitativa, um extenso ninho parasitário pode ser observado na imagem H. H & E 200X.

DISCUSSÃO

A infecção chagásica pelas cepas Y e Colombiana induziu a mudanças quantitativas e qualitativas no desempenho locomotor dos animais infectados. Ambos os grupos apresentaram padrões característicos na atividade locomotora e comportamento exploratório durante a evolução das infecções quando submetidos à análise pelos testes do campo aberto, na ‘Basso Mouse Scale’ (BMS) e *Rota rod*.

Os resultados deste estudo indicam que a quantidade de quadrados percorridos durante o teste do Campo Aberto foi o parâmetro que primeiro detectou, no 7º dia pós-infecção, diferença na locomoção dos animais de ambos os grupos infectados. A infecção pela cepa Y promoveu redução progressiva da exploração do Campo Aberto até o 12º dia enquanto os animais infectados pela Colombiana apresentaram menor quantidade de quadrados percorridos do 7º ao 43º dia. As alterações biomecânicas observadas durante a marcha dos animais infectados surgiram a partir do 9º dia para cepa Y e 21º dia para cepa Colombiana. A dificuldade no controle da cauda foi o primeiro evento observado a partir da avaliação pelo método BMS, esta, precedendo a instabilidade de tronco leve em ambos os grupos com o avanço da infecção. Os camundongos infectados pela cepa Y apresentaram, no último dia de avaliação, grave instabilidade de tronco representada por incapacidade de sustentação da cauda acima do solo e grande oscilação da região posterior do tronco.

Os achados locomotores estiveram associados à taxa de sobrevivência cumulativa, parasitemia e aspectos morfológicos do miocárdio e músculo esquelético. A alta mortalidade dos animais infectados pela cepa Y e a redução significativa da parasitemia no grupo cepa Colombiana foram os principais determinantes para interrupção das avaliações locomotoras. O 7º dia do grupo cepa Y foi marcado por baixa parasitemia, a presença de raros ninhos de amastigotas nos músculos isquiotibiais e discretos focos inflamatórios no miocárdio e músculos isquiotibiais. O 12º dia deste grupo, marcado por grande piora do desempenho locomotor em todas as avaliações, apresentou correlação com o início do óbito dos animais, pico parasitêmico, alto parasitismo tecidual e alterações morfológicas mais acentuadas no músculo esquelético.

O 7º dia do grupo cepa Colombiana, início das alterações no Campo Aberto, foi marcado por baixa parasitemia, sem a presença de ninhos de amastigotas nos tecidos avaliados e infiltrado inflamatório focal nos músculos isquiotibiais. A partir do 21º dia,

os animais deste grupo também apresentaram piora na qualidade da marcha, onde, no 26º dia esteve correlacionado com o pico parasitêmico, maior presença de ninhos de amastigotas e intenso infiltrado inflamatório. O 32º dia confirmou a evolução progressiva das alterações morfológicas com a presença de infiltrado inflamatório difuso e intenso e sinais de substituição de fibras musculares esqueléticas por tecido adiposo e fibroso. Nesta etapa foram encontrados raros ninhos de amastigotas, houve redução da parasitemia e manutenção do padrão locomotor observado no 26º dia que se perpetuou até o 43º dia.

Alterações etológicas em animais infectados podem promover o ciclo de diferentes espécies de parasitos. Cães infectados com o vírus da raiva são agressivos e mordem (transmitindo o patógeno), quando infectados por *Leishmania infantum* ou *L. donovani* se locomovem pouco (desenvolvendo onicogrifose) e, animais com alopecia são mais sujeitos ao ataque pelos flebotomíneos (MOORE, 2002). Em contrapartida, o parasitismo por *Toxoplasma gondii* produz maior inquietação e movimentação, favorecendo o predatismo do roedor (VANNIER-SANTOS & LENZI 2011).

Fiore *et al.*, (1996) forneceram evidências de que a infecção por *Schistosoma mansoni* afetou o perfil comportamental de camundongos fêmeas, evidenciado por mudanças na atividade locomotora no campo aberto, no teste do campo claro/escuro, sensibilidade à dor sobre a placa quente, além de, redução do peso corporal e aumento do 'grooming'. Os efeitos comportamentais da cepa ANKA de *Plasmodium berghei* foram avaliados através do protocolo de avaliação SHIRPA, que a partir de uma série de observações fornece um perfil comportamental e funcional através da observação do desempenho individual. Lalonde *et al.*, (2005), verificaram uma associação temporal entre os parâmetros inflamatórios no SNC de camundongos infectados e as alterações neurológicas que precederam as mudanças comportamentais neuro-motoras do protocolo de avaliação SHIRPA. Ademais, a associação entre este protocolo e os níveis de parasitemia pode ser utilizada no prognóstico da doença infecciosa cerebral por *P. berghei* (Cepa ANKA) em camundongos C57Bl/6 (LACERDA-QUEIROZ *et al.*, 2010).

A associação entre parâmetros como parasitemia, mudanças morfológicas e bioquímicas com exames comportamentais surge como um padrão mais completo de avaliação da evolução das infecções parasitárias na medida em que correlacionam aspectos microscópicos, moleculares e celulares com características clínicas macroscópicas inerentes às necessidades fundamentais de sobrevivência dos animais como capacidade de deslocamento, força, flexibilidade e sensibilidade.

A relação entre a infecção chagásica experimental e características locomotoras, comportamentais e histopatológicas tem sido descrita há muito tempo. O modelo de infecção crônica pela cepa Colombiana pode induzir a menor atividade locomotora espontânea associada à fraqueza muscular, menor peso corporal, dificuldade respiratória durante a avaliação e lesões histopatológicas no músculo esquelético e cardíaco (FEDERICI et al., 1964). Animais infectados pela cepa Tulahuén apresentaram degeneração e desintegração da junção neuromuscular do quadríceps, diminuição da bainha de mielina no nervo isquiático e presença degeneração e necrose no corno ventral na medula espinal lombar (MOLINA et al., 1987). Os trabalhos supracitados são corroborados pelos achados deste estudo onde, em dois modelos utilizados (Cepas Y e Colombiana), a infecção chagásica aguda induziu modificações do comportamento locomotor associado ao aumento da carga parasitária e alterações morfológicas dos músculos estudados.

O teste do campo aberto alcançou o status de um dos instrumentos mais amplamente utilizados em estudos sobre comportamento animal. Sua popularidade se deve em grande parte à simplicidade do aparelho e pela facilidade de mensurar comportamentos definidos. Em adicional, esta avaliação é sensível a variações genéticas, manipulações fisiológicas e farmacológicas (WALSH & CUMMIS, 1976). Caradonna & Pereiraperrin, (2009) demonstraram que independente da fase da infecção, os animais infectados pelo *T. cruzi* podem exibir uma diminuição na atividade locomotora durante o teste do campo aberto. Tais resultados foram obtidos com a linhagem C57BL/6, a qual é resistente à meningoencefalite aguda, indicando que a dificuldade locomotora não está associada com inflamação do SNC, mas, é um resultado direto da infecção pelo *T. cruzi* como observado neste estudo. A infecção pela cepa Y e Colombiana pode reduzir a capacidade locomotora e de exploração no teste do campo aberto nas fases aguda e crônica, assim como, aumentar o tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado e suspensão da cauda na fase aguda (Cepa Y e Colombiana) e crônica (Cepa Colombiana) (VILAR-PEREIRA et al., 2012).

A exposição repetida ao campo aberto pode influenciar os comportamentos de algumas espécies de roedores (BOLIVAR et al., 2000). O padrão mais comum nas avaliações iniciais é o aumento de comportamentos relacionados ao medo, como estiramento do corpo e atividade nos cantos e paredes do campo aberto. No entanto, com a repetição dos testes, mais exploração e atividade locomotora é observado (CHOLERIS et al., 2001). Neste estudo, o grupo controle apresentou menor quantidade

de eventos locomotores nos primeiros dias de avaliação, assim como, os eventos associados à ansiedade e medo apresentaram maior frequência nesta etapa, e, posteriormente, houve inversão deste padrão ao longo dos dias. Os grupos infectados apresentaram comportamento semelhante em relação aos eventos de medo e ansiedade, porém, houve redução significativa da quantidade movimentação no campo aberto após a primeira semana de infecção.

Estudos sobre a análise de fatores de comportamento no campo aberto geralmente apontam para três eventos mais significativos, porém, tais fatores podem variar entre os estudos. O total de quadrados cruzados (CRUSIO & SCHWEGLER, 1987; RAMOS et al., 1997; JAHKEL et al., 2000), orientação vertical (JAHKEL et al., 2000), locomoção no espaço central (RAMOS et al., 1997), ‘freezing’ (JAHKEL et al., 2000), ‘grooming’ (CRUSIO & SCHWEGLER, 1987) e frequência de evacuação (CRUSIO & SCHWEGLER, 1987; RAMOS et al., 1997) são os fatores mais citados. Com base nos diferentes estudos, a capacidade de cruzar as linhas e quadrados do campo aberto é o fator que mais se repete nos trabalhos como um dos principais fatores de análise comportamental, porém, com níveis de variância diferente (CRUSIO & SCHWEGLER, 1987; RAMOS et al., 1997; JAHKEL et al., 2000). Este achado corrobora os relatos de que a quantidade de quadrados percorridos no campo aberto foi a primeira variável a detectar modificações no padrão locomotor dos grupos infectados no presente estudo.

Durante a avaliação do campo aberto os grupos infectados pela cepa Y e Colombiana apresentaram dificuldade em manter a frequência de orientação vertical sobre as patas posteriores, onde, no 12º dia os animais infectados pela cepa Y apresentaram dificuldade para alcançar água e ração nas caixas de armazenamento. Tais achados podem ocorrer devido a alteração da contratilidade muscular tanto na fase inflamatória (30-32 dias) quanto na fase fibrótica (45-47 dias) (RAMIREZ-ARCHILA et al., 2011) provavelmente devido à ação de anticorpos específicos para antígenos musculares e neurais (GONZÁLEZ-CAPPA, et al., 1987, IOSA et al., 1990). Além disso, Mirkin et al., (1994) demonstraram que a infecção por cepas reticulotrópica ou miotrópica estiveram relacionadas a alterações eletromiográficas na amplitude, duração e percentual de Potenciais de Unidade Motora (PUMs) polifásicos dos músculos isquiotibiais com sinais de miopatia e desnervação em comparação a animais normais. O número de linhas cruzadas e a frequência de elevações também podem ser utilizadas como medidas de exploração e ansiedade (WALSH & CUMMINS, 1976). A alta

frequência desses comportamentos indica aumento da locomoção e/ou um baixo nível de ansiedade (BLANCHARD et al., 2001).

Em nosso estudo, os resultados das mensurações de reações de auto-higienização, fezes e urina apresentaram modificações pontuais na comparação entre os grupos. Este dado reforça a hipótese de que o prejuízo da locomoção ocorreu em consequência das lesões musculares, especialmente no músculo esquelético. Lister, (1990) demonstrou que as mensurações de fezes e urina são muitas vezes utilizadas como medidas de ansiedade, mas a validade da defecação como parâmetro desta avaliação tem sido questionada. Uma redução da locomoção pode aumentar a defecação por ativação do sistema autônomo (HALL, 1934). No entanto, fezes e urina em um ambiente novo são sinais de emotividade, fato que não deve ser relacionado com medo ou timidez, não havendo relação significativa entre medo, micção e defecação medidos no teste do campo aberto (BINDRA & THOMPSON, 1953).

Dificuldade na sustentação da cauda e/ou tronco representaram as principais características prejudicadas na marcha dos animais infectados pelas cepas Colombiana e Y do *Trypanosoma cruzi* neste estudo. A locomoção em camundongos normais, independentemente da espécie, é tipificada pelo suporte de peso consistente durante a fase de apoio, um equilíbrio adequado do tronco e cauda, e um padrão facilmente reconhecível de movimento entre os membros anteriores e posteriores (ENGESSER-CESAR et al., 2005; BASSO et al., 2006). O controle adequado da cauda compreende a manutenção de sua estabilidade sem a presença de movimentos no sentido crânio-caudal ou látero-lateral durante a locomoção, além disso, a pelve curvada, com movimentos de oscilação lateral e/ou inclinação associado ao comportamento inadequado da cauda, descrito acima, é caracterizado como instabilidade leve de tronco (ENGESSER-CESAR et al., 2005; BASSO et al., 2006).

Com a progressão da doença de Chagas, mudanças no sistema neuro-motor e sensorial podem ser encontradas tanto na fase aguda quanto na fase crônica desta patologia podendo apresentar, em última análise, paralisia flácida dos membros posteriores de camundongos infectados (GONZÁLEZ-CAPPA, et al., 1987, LOZAVIO et al., 1989). Ademais, alguns animais podem apresentar sintomas crescentes da fase aguda para crônica como tendência a cair, adotar movimento circular voltado para o mesmo lado, andar cifótico, perda do tônus da cauda e paralisia durante a infecção pela cepa Colombiana (SILVA et al., 1999) e animais chagásicos com deficiência de *decay-accelerating factor 1* (DAF-1) podem apresentar anormalidades na postura e marcha

com oscilação severa do tronco durante a fase crônica (SOLANA et al., 2003). Os achados supracitados foram observados neste estudo.

Os valores da escala BMS mais observados neste estudo foram de 8 pontos no escore e 9 ou 10 pontos no subescore após infecção pelas cepas Y e Colombiana do *T. cruzi*. As referidas mensurações assemelham-se aos resultados encontrados em modelos de laminectomia no nível T8-T9 para produção de grupo controle em estudos sobre lesão da medula espinal (KIM et al., 2008; HOSCHOUER et al., 2009). É importante ressaltar, que os animais infectados pela cepa Y apresentaram instabilidade de tronco grave, impossibilitando o deslocamento normal durante a avaliação, além de, ser observada a presença de fezes e urina no quarto posterior pela dificuldade em mantê-lo acima do solo. Tal comprometimento é descrito como a perda da capacidade em manter o calcanhar, joelho e base da cauda acima do solo durante a marcha (ENGESSER-CESAR et al., 2005; BASSO et al., 2006). Nossa principal hipótese é que a associação entre o parasitismo tissular, processo inflamatório e destruição de fibras musculares nos músculos isquiotibiais e tríceps sural ao longo da infecção prejudicam a manutenção da postura dinâmica durante a marcha, especialmente a plantiflexão com elevação do calcanhar, posição característica da pata na fase de apoio dos camundongos.

Com base na avaliação realizada pelo rota *rod*, a infecção aguda pela cepa Colombiana não provocou mudanças na capacidade de coordenação e equilíbrio locomotor durante todo período de avaliação, provavelmente devido à baixa rotação utilizada (5 rpm). Em contrapartida, a infecção crônica pela cepa Colombiana reduziu significativamente a atividade locomotora espontânea (2,9 rpm), comparada ao grupo controle (20,4 rpm) durante avaliação realizada em uma roda feita de malha de arame fixada num eixo de bicicleta, onde os animais caminhavam em períodos de 50 minutos, 2 a 4 vezes por semana (FEDERICI et al., 1964). Neste estudo, o grupo infectado pela cepa Y apresentou redução significativa da capacidade em se manter na barra giratória do *rota rod* nos dois últimos dias de avaliação. Especificamente no 12º dia após a infecção, este grupo apresentou uma média de tempo próximo a zero e alguns animais estavam tão comprometidos que não foram capazes de se sustentar no equipamento. Este padrão pode ser observado em modelos de lesão medular (ITO et al., 2008), lesão cerebral traumática (LIU et al., 2012) e acidente vascular cerebral (POLLAK et al., 2012).

Após uma semana de início da infecção, a cepa Y do *T. cruzi* ocasionou baixa parasitemia e poucos achados histopatológicos no coração e tríceps sural, porém, nos

isquiotibiais houve presença de ninhos parasitários e infiltrado focal. No 12º dia, período do pico parasitêmico e maior taxa de óbitos, numerosos ninhos de pequeno tamanho sem reação inflamatória foram observados no miocárdio. No músculo esquelético, houve presença de ninhos de amastigotas com ruptura de fibras musculares e áreas de tecido adiposo associado ao depósito de colágeno no interstício. Borges et al., (1992) observaram em camundongos suíços infectados com 4×10^3 tripomastigotas da cepa Y, pico parasitêmico no 9º dia e óbito de quase todos os animais até o 14º dia. A Cepa Y provoca lesões semelhantes em espécies diferentes, e.g. *M. musculus* e *Calomys callosus*, com pouco parasitismo e macrófagos cardíacos na fase inicial e moderada miocardite e miosite a partir de 10 dias (BORGES et al., 1992, MAGALHÃES-SANTOS et al., 2004). Os músculos diafragma, extensor longo dos dedos, sóleo, pectíneo e psoas estão sujeitos à presença de ninhos parasitários após a infecção pela cepa Y, especialmente na fase aguda (12 e 20 dias), apresentando maior parasitismo e processo inflamatório nos músculos sóleo e diafragma (MALDONADO et al., 2004).

Ao final da primeira semana de infecção do grupo cepa Colombiana, houve baixa parasitemia e ausência de amastigotas nos tecidos avaliados. Entretanto, inflamação tecidual focal, infiltrado perivascular e intersticial leve e centralização nuclear em algumas fibras musculares foram observadas nos músculos isquiotibiais. Federici *et al.* (1964) descreveram a fase aguda da infecção pela cepa Colombiana com o padrão de baixa mortalidade e parasitemia com detecção a partir do 8º dia, pico no 30º dia e ausência de parasitos no 40º dia após a infecção. Além disso, a piora da atividade locomotora pode estar relacionada com extensas áreas de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco e muscular esquelético com sinais de miopatia (FEDERICI et al., 1964). Os infiltrados encontrados nos tecidos muscular e nervoso após infecção pelo *T. cruzi* apresentam células mononucleares e polimorfonucleares, representadas principalmente pela presença de linfócitos CD 4⁺ e CD 8⁺ (MIRKIN et al., 1994; 1997), macrófagos (LOSAVIO et al., 1989; TEKIEL et al., 2001) e células *natural killer* (NK) (MIRKIN et al., 1994) que atuam diretamente na promoção da inflamação local durante a resposta antiparasitária. *C. callosus* infectados com uma cepa miotrópica de *T. cruzi* apresentaram miocardite difusa com necrose de células cardíacas e substituição do tecido cardíaco por infiltrado de macrófagos e proliferação de fibroblastos 30 dias após a infecção. O músculo esquelético com destruição celular e intenso infiltrado intersticial mononuclear com depósito de colágeno intersticial foi observado na fase aguda (26 e 30 dias) (ANDRADE et al., 1994, MAGALHÃES-

SANTOS et al., 2004). Os dados supracitados assemelham-se com o padrão histopatológico observado no grupo infectado pela cepa Colombiana.

Na fase aguda, o depósito fibroso pode ser constituído por colágeno tipo III e IV, laminina e fibronectina sendo mais intenso após 30 dias e associado à reação inflamatória. (MAGALHÃES-SANTOS et al., 2002). Nesta fase, a inflamação presente na lesão cardíaca e esquelética pela cepa colombiana conta com a presença de IFN- γ , TGF- β e TNF- α marcados positivamente nos meios intra e extracelulare, no citoplasma de macrófagos e ao redor de lesões necróticas (MAGALHÃES-SANTOS & ANDRADE, 2005). O presente trabalho teve como foco principal preencher uma lacuna existente na literatura científica pela falta de estudos experimentais sistemáticos sobre a função locomotora durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*. A infecção pela cepa Y e Colombiana induz a um padrão característico de piora do desempenho locomotor que está associado à evolução da infeccão durante esta fase.

CONCLUSÃO

A avaliação do desempenho locomotor dos animais infectados pelas cepas Y e Colombiana realizado neste estudo demonstrou que a quantidade de locomoção é o primeiro parâmetro comprometido na fase aguda sem interferência de comportamentos de medo e ansiedade em ambas as cepas. Além de, com a progressão da infecção, a perda do controle da cauda e/ou instabilidade de tronco está associado com a progressão da infecção. Entretanto, perda de equilíbrio e coordenação esteve alterado somente na infecção pela cepa Y próximo ao óbito dos animais. Neste contexto, os achados histopatológicos de lesões e parasitismo muscular estão associados com a piora do desempenho locomotor.

O presente trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento de uma escala específica para análise locomotora de camundongos com infecção chagásica experimental. Tal escala, poderá ser utilizada não somente no desenvolvimento de uma avaliação funcional específica e caracterização do comprometimento locomotor durante o curso da infecção chagásica experimental, mas também permitirá estabelecer uma nova estratégia de avaliação e acompanhamento de regimes terapêuticos em teste para a doença. Para tanto, mais estudos sobre o desempenho locomotor na fase crônica e maior correlação com dados bioquímicos e morfológicos devem ser explorados a fim desenvolver ferramentas de avaliação fidedignas para análise prospectiva da fisiopatologia da doença de Chagas experimental.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, J.; ENGLUND, P.; SUNNEMARK, D.; DAHLSTEDT, A.; WESTERBLAD, H.; NENNESMO, I.; ORN, A.; LUNDBERG, I.E. CBA/J mice infected with *trypanosoma cruzi*: an experimental model for inflammatory myopathies. **Muscle and Nerve.**, v. 27, p. 442–448, 2003.
- ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no recôncavo Baiano. **Rev. Pat. Trop.**, v. 3, p. 65-121, 1974.
- ANDRADE, S.G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL A.S.; GRIMAUD, J.A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem. Ins.t Oswaldo Cruz.**, v. 86, p. 187-200, 1991.
- ANDRADE, S.G.; KLOETZEL, J.K.; BORGES, M.M.; FERRANS, V.J. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. **Mem. Ins.t Oswaldo Cruz.**, v. 89(3), p. 379-393, 1994.
- ANDRADE, S. G; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev Soc Bras Med Trop.** 30(1), 27-35, 1996.
- BASSO, D.M.; FISHER, L.C.; ANDERSON, A.J.; JAKEMAN, L.B.; MCTIGUE, D.M.; POPOVICH, P.G. Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains. **J. Neurotrauma.**, v. 23, p. 635–659, 2006.
- BINDRA, D.; THOMPSON, W. R. An evaluation of defecation and urination as measures of fearfulness. **Journal of Comparative and Physiological Psychology.**, 46, 43-45, 1953.

- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.**, v. 25, p. 205-218, 2001.

- BRENER, Z. The therapeutic activity of furaltadone, furazolidone and furadantine in experimental infection of the mouse by *Trypanosoma cruzi.*, **Hospital (Rio J).**v. 60, p. 947-51, 1961.

- BORGES, M.M.; ANDRADE, S.G.; PILATTI, C.G.; PRADO JUNIOR, J.C.; KLOETZEL, J.K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 87, p. 493-502, 1992.

- BOLIVAR, V. J.; CALDARONE, B. J.; REILLY, A. A.; LORRAINE, F. Habituation of activity in an open field: a survey of inbred strains and F1 hybrids. **Behavior Genetics.**, v. 30, p. 285-293, 2000..

- BROWN, R. E.; COREY, S.C.; MOORE, A. K. Differences in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice. **Behavior Genetics.**, v. 26, p. 263-271, 1999.

- CAMANDAROBA E.L.; PINHEIRO, L.C.M.; ANDRADE, S.G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotopeme in the intragastric experimental infection. **Rev Inst Med Trop S Paulo.**, v. 44, p. 97-103, 2002.

- CARADONNA, K.; PEREIRA PERRIN, M. Preferential Brain Homing following Intranasal Administration of *Trypanosoma cruzi.* **Infection and Immunity.**, apr, p. 1349–1356, 2009.

- CARDOSO, J.E.; BRENER, Z. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi.*, **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 75(3-4), p. 97-104, 1980.

- CARREY, N.; MCFADYEN, M.; BROWN, R.E. Effects of chronic methylphenidate administration on the locomotor and exploratory behaviour of prepubertal mice. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology.**, v. 10, p. 277-286, 2000.

- CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.**, v. 25, p. 235-260, 2001.

- COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2012 Jun;45(3):286-96.

- CRUSIO, W. E.; SCHWEGLER, H. Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field habituation in the mouse. **Behavioural Brain Research.**, v. 26, p. 153-158, 1987.

- ENGESSER-CESAR, C.; ANDERSON, A.J.; BASSO, D.M.; EDGERTON, V.R.; COTMAN, C.W. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury. **J. Neurotrauma.**, v. 22, p. 157–171, 2005.
- FEDERICI, E.E ; ALBEMAN, W.H.; NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 13, p. 272-280, 1964.

- FIORE, M.; MORONI, R.; ALLEVA, E.; ALOE, L. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on mouse behavior. **Experimental Parasitology.**, 83, 46–54, 1996.

- GONÇALVES, M.F.; UMEZAWA, E.S.; KATZIN, A.M.; DE SOUZA, W.; ALVES, M.J.; ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp Parasitol.**, v. 72, p. 43-53, 1991.

- GONZÁLEZ-CAPPA, S.M.; SANZ, O.P.; MULLER, L.A.; MOLINA, H.A.; FERNÁNDEZ, J.; RIMOLDI, M.T.; SICA, R.E.; Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chaga's disease. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 36(1), p. 41-5, 1987.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. 1. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology.**, v.18, p. 382-403, 1934.
- HART, B. L. Behavioural adaptations to pathogens and parasites: Five strategies. **Neuroscience Biobehaviora Review.**, v. 14, p. 273–294, 1990.
- HOSCHOUER, E.L.; BASSO, D.M.; JAKEMAN, L.B. Aberrant sensory responses are dependent on lesion severity after spinal cord contusion injury in mice. **Pain.**, February, p. 328, 2010.
- IOSA, D.; DEQUATTRO, V.; LEE, D.D.; ELKAYAM, U.; CAEIRO, T.; PALMERO, H. Pathogenesis of cardiac neuro-myopathy in Chagas' disease and the role of the autonomic nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System.**, v. 30, p. 83-88, 1990.
- ITO, M.; NATSUME, A.; HIROKI, T.; SHINJI, S.; OHNO, M.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J. Type I Interferon Inhibits Astrocytic Gliosis and Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury by Deactivation of the MEK=ERK Pathway. **Journal of Neurotrauma.**, v. 26, p. 41–53, 2009.
- JAHKEL, M.; RILKE, O.; KOCH, R.; OEHLER, J. Open field locomotion and neurotransmission in mice evaluated by principal component factor analysis-effects if housing condition, individual activity disposition and psychotropic drugs. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry.**, v. 24, p. 61-84,2000.

- KIM, J.H.; TU, T.W.; BAYLY, P.V.; SONG, S.K. Impact speed does not determine severity of spinal cord injury in mice with fixed impact displacement. **J Neurotrauma.**, August, v. 26(8), p. 1395–1404, 2009.

- KIERSZENBAUM, F. Chaga's disease and the autoimmunity hypothesis. **Clin Microbiol Rev.**, v. 12(2), p. 210-23, 1999.

- KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends Parasitol.**, v. 21(11), p. 513-6, 2005.

- KO, M.H.; CHEN, W.P.; LIN-SHIAU, S.Y.; HSIEH, S.T.. Age-dependent acrylamide neurotoxicity in mice: morphology, physiology, and function. **Exp Neurol.**, v. 158(1), p. 37-46, 1999.

- KUMON, M.; YAMAMOTO, K.; TAKAHASHI, A.; WADA, K.; WADA, E. Maternal dietary restriction during lactation influences postnatal growth and behavior in the offspring of mice. **Neurochem Int.**, v. 57(1), p. 43-50, 2010.

- LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; MIRANDA, A.S.; AMARAL, D.C.; CAMARGOS, E.R.; CARVALHO, L.J.; HOWE, C.L.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in Plasmodium berghei (strain ANKA)-infected mice. **Exp Parasitol.**, v. 125(3), p. 271-8, 2010.

- LALONDE, R.; DUMONT, M.; STAUFENBIEL, M.; STRAZIELLE, C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. **Behavioural Brain Research.**, v. 157, p. 91–98, 2005.

- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacological Theory**, 46, 321-340, 1990.

- LIU, N.K.; ZHANG, Y.P.; O'CONNOR, J.; GIANARIS, A.; OAKES, E.; LU, Q.B.; VERHOVSHEK, T.; WALKER, C.; SHIELDS, C.B.; XU, X.M. A bilateral head injury that shows graded brain damage and behavioral deficits in adult mice. **Brain Res.**, Dec 28, 2012.

- LOZAVIO, A.S.; SICA, R.E.; SANZ, O.P.; MIRKIN, G.; GONZÁLEZ-CAPPA, S.M.; MUCHNIK, S. Functional changes of the sciatic nerve in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41(5), p. 539-547, 1989.

- MAGALHÃES-SANTOS, I.F.; SOUZA, M.M.; LIMA, C.S.C.; ANDRADE, S.G. Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Immunohistochemical identification of extracellular matrix components. **Mem. Ins.t Oswaldo Cruz.**, v. 97(5), p. 703-710, 2002.

- MAGALHÃES-SANTOS, I.F.; SOUZA, M.M.; LIMA, C.S.C.; ANDRADE, S.G. Infection of *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) with Strains of Different *Trypanosoma cruzi* Biomes: Pathogenicity, Histotropism, and Fibrosis Induction. **Mem. Ins.t Oswaldo Cruz.**, v. 99(4), p. 407-413, 2004.

- MAGALHÃES-SANTOS, I.F.; ANDRADE, S.G. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Ins.t Oswaldo Cruz.**, v. 100(5), p. 555-561, 2005.

- MALDONADO, I.R.S.C.; FERREIRA, M.L.; CAMARGOS, E.R.S.; CHIARI E.; MACHADO, C.R.S.; Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi*-induced myositis in rats. **Histol Histopathol.**, v. 19, p. 85-93, 2004.

- MARINHO, C.R.F.; BUCCI, D.Z.; DAGLI, M.L.Z; BASTOS, K.R.B.; GRISOTTO, M.G.; Luiz R. SARDINHA, L.R.; BAPTISTA, C.R.G.M.; GONÇALVES, C.P.; LIMA, M.R.; ÁLVAREZ, J.M. Pathology Affects Different Organs in Two Mouse Strains Chronically Infected by a *Trypanosoma cruzi* Clone: a Model for Genetic Studies of Chaga's Disease. **Infection and immunity.**, Apr, p. 2350–2357, 2004.

- MIRKIN, G.A.; JONES, M.; SANZ, O.P.; REY, R.; SICA, R.E.P.; GONZÁLEZ-CAPPA, S.M. Experimental Chaga's disease: Electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **Clinical Immunology and Immunopathology.**, v. 73(1), p. 69-79, 1994.

- MIRKIN, G.A.; CELENTANO, A.M.; MALCHIODI, E.L.; JONES, M.; GONZÁLEZ-CAPPA, S.M. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. **Clin Exp Immunol.**, v. 107, p. 328:334, 1997.

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

- MOLINA, A.M.; CARDONI, R.L.; RIMOLDI, M.T.; The neuromuscular pathology of experimental Chaga's disease. **Journal of the Sciences.**, v. 81, p. 287-300, 1987.

- MOORE J. Parasites and the Behavior of Animals. **Oxford University Press.**, 338 pages, 2002.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Report of the first meeting of the scientific working group of Chaga's disease. **Buenos Ayres. Argentina. W.H.O.**, p. 77:3, 1977.

- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Fact sheets (neglected tropical diseases): Chagas disease (American trypanosomiasis). Geneva: Fact sheet n° 340, **WHO**; Mar. 2013.

- PITTELLA, J.E.H. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 103, p. 973—978, 2009.

- PINHO, R.T.; VANNIER-SANTOS, M.A.; ALVES, C.R.; MARINO, A.P.; CASTELLO BRANCO, L.R.; Lannes-Vieira, J. Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. **Acta Trop.**, v. 83(2), p. 103-115, 2002.

- PIZZI, T.; PRAGER, R. Immunity to infection induced by culture of *Trypanosoma cruzi* of attenuated virulence; preliminary communication. **Bol Inf Parasit Chil.**, v. 7(2), p. 20-1, 1952.

- POLLAK, J.; DOYLE, K.P.; MAMER L.; SHAMLOO, M.; BUCKWALTER, M.S.; Stratification substantially reduces behavioral variability in the hypoxic-ischemic stroke model. **Brain Behav.**, v. 2(5), p. 698-706, 2012.

- PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.M.; KHAN, I.A.; NAVARRO, V.S.; VASAVADA, B.C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **Int J Cardiol.**, v. 14, p. 279-83, 2007.

- RAMIREZ-ARCHILA, M.V.; MUÑIZ, J.; VIRGEN-ORTIZ.; A.; NEWTON-SÁNCHEZ, O.; MELNIKOV, V.G.; DOBROVINSKAYA, O.R. *Trypanosoma cruzi*: Correlation of muscle lesions with contractile properties in the acute phase of experimental infection in mice (*Mus musculus*). **Experimental Parasitology.**, v. 128, p. 301–308, 2011.

- RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, p. 57-69, 1997.

- RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**. 2012 Jun;26(2):275-91.

- SILVA, A.A.; PEREIRA, G.V.; SOUZA, A.S.; SILVA, R.R.; ROCHA, M.S.; LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-Induced central nervous system alterations: From the entry of inflammatory cells to potential cognitive and psychiatric abnormalities. **Journal of Neuroparasitology**, v. 1, 13 pages, 2010.

- SOLANA, M.E.; FERRER, M.F.; NOVOA, M.M.; SONG, W.C.; GÓMEZ, R.M. Decay-accelerating factor 1 deficiency exacerbates *Trypanosoma cruzi* induced murine chronic myositis. **Muscle and Nerve**, 2003.

- TEKIEL, V.; LOSAVIO, A.; JONES, M.; MUCHNIK, S.; GONZÁLEZ-CAPPA, S.M. Changes in the mouse sciatic nerve action potential after epineural injection of sera from *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 533-539, 2001.

- TORRES, S.H.; FINOL, H.J.; OCA, M.M.; VASQUEZ, F.; PUIGBO, J.J.; LOYO, J.G. Capillary damage in skeletal muscle in advanced Chaga's disease patients. **Parasitol Res**, v. 93, p. 364–368, 2004.

- UCHIHASHI, Y.; KURIBARA, H.; MORITA, T.; FUJITA, T. The repeated administration of ketamine induces an enhancement of its stimulant action in mice. **Jpn J Pharmacol**, v. 61(2), p. 149-51, 1993.

- VANNIER-SANTOS, M.A.; LENZI, H.L. Parasites or cohabitants: cruel omnipresent usurpers or creative "éminences grises"? **J Parasitol Res**, 2011;2011:214174.

- VILAR-PEREIRA, G.; SILVA, A.A.; PEREIRA, I.R.; SILVA, R.R.; MOREIRA, O.C.; ALMEIDA, L.R.; SOUZA, A.S.; ROCHA, M.S.; LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. **Brain, Behavior, and Immunity.**, v. 26, p. 1136–1149, 2012.

- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. **Psychological Bulletin.**, v. 83, p. 482-504, 1976.

- ZUK, M. The role of the parasite in sexual selection: Current evidence and future directions. **Advances in the Study of Behavior.**, v. 21, p. 39–68, 1992.