



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Interações linfócitos/células nervosas, *in vitro*, na infecção experimental
pelo *Trypanosoma cruzi*: possível participação da matriz extracelular**

Fernanda Pinto Mariz

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular (Imunologia)**

Rio de Janeiro, Dezembro de 2002



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Interações linfócitos/células nervosas, *in vitro*, na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: possível participação da matriz extracelular.

Fernanda Pinto Mariz

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular (Imunologia)**

Orientador: Wilson Savino

Rio de Janeiro, Dezembro de 2002

Fernanda Pinto Mariz

Interações Linfócitos/células nervosas, *in vitro*, na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: possível participação da matriz extracelular.

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular (Imunologia)**

Orientador: Wilson Savino

Banca examinadora:

Alda Maria Da Cruz – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Sandra Konig – Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Solange Lisboa de Castro – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Revisor/Suplente:

Claude Pirmez – Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Suplente:

Jussara Machado Lagrota-Cândido - Instituto de Biologia - UFF

Rio de Janeiro, Dezembro de 2002

Ficha catalográfica

Pinto-Mariz, Fernanda

Interações linfócitos/células nervosas, *in vitro*, na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: possível participação da matriz extracelular /
Rio de Janeiro Fiocruz/IOC, 2002.

XIII, 93p.

Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Palavras-chave: Interações imunoneuroendócrinas; 2. Células neuronais; 3. Linfócitos T;
4. Matriz extracelular; 5. *Trypanosoma cruzi*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre presente em minha vida, iluminando todos os meus passos.

Aos meus pais, **Luiz Afonso** e **Marilena**, por toda a educação, amor e oportunidades que sempre me deram. Por estarem sempre ao meu lado, me dando força em tudo o que eu faço, e por serem grandes exemplos como seres humanos e profissionais. À minha mãe pelas ajudas no computador, por agüentar as minhas reclamações, etc, etc, etc...

Ao **Rodrigo**, por compartilhar de todos os momentos. Pelos diversos copos d'água e lanches fornecidos **com carinho** durante todo este período;

Aos meus queridos avós, **João e Itália**, por tudo o que fizeram, e ainda fazem, por mim. Pelos alegres e bons momentos que passamos juntos, os quais sempre uniram nossa família. Acima de tudo, por serem verdadeiros exemplos de vida!

À minha tia (“**titita**”), por tomar conta dos meus primeiros passos em seu colégio (“Grilo Falante”) e por me “alfabetizar”. Ao **Orlando** pelas guloseimas que algumas vezes acompanharam bem de perto a redação deste trabalho!

Ao **Guilherme** e à **Flávia** pelos momentos de diversão e descontração. À **Cláudia** pelo carinho e apoio.

Ao **Alexandre** pela importante ajuda durante a realização deste trabalho;

Ao meu orientador, **Savino**, por quem tenho grande admiração e carinho. Por, há seis anos, ter-me “adotado”, e por estar sempre me ajudando a crescer e a trilhar os meus caminhos. Obrigada por TODAS as oportunidades e por acreditar em mim. Sei que poderei sempre contar com a sua amizade!

Àquele que sempre esteve por perto (ou mesmo de longe!!) participando da minha formação: meu querido amigo **Vinícius**. Pelos divertidos momentos de experimentos, pelas conversas, pela amizade... Há até quem diga que eu tenha herdado o seu jeito “meio enrolado”!!!!

Ao **Désio**, por estar sempre disposto a me ajudar. Você foi fundamental na realização deste trabalho. Obrigada pelos “quebra-galhos”, pelas discussões e pela companhia durante os experimentos, o que os tornaram muito mais agradáveis e divertidos!!!!

Ao **Ingo**, sempre tão amigo, atrapalhado e com o dom de divertir todos ao seu redor. Foi bom contar com a sua amizade durante todos estes anos!!!! Obrigada pelos conselhos, pelas ajudas, e pelos bons momentos dentro e fora do Laboratório;

À **Dani** e à **Juju**, por estarem sempre por perto em bons e maus momentos. Pelo apoio que sempre me deram em tudo, pelos experimentos, ajudas com o citômetro de fluxo, enfim, pela amizade!! À **Juju**, não poderia deixar de agradecer pelas “lindas foquinhas”!!

Ao **Kenji**, que com este jeito especial conquista a todos no laboratório. Valeu pelas “dicas”, pelo carinho, pela ajuda na reta final da tese, e pela companhia durante todos estes anos;

À **Paulinha**, minha amiga mais “estressada”, e à **Drika**, pela força que me deram durante todo este período;

À **Lilica**, por compartilhar dos longos experimentos em dias de “pico”. Pela companhia e conversas até “altas horas”;

À **Suse**, pelo carinho e pela contribuição com a minha formação. Afinal, você também me “adotou” na iniciação científica, lembra!???

Ao povo mais experiente do laboratório, que a cada ano contribue com o crescimento de todos: ao **Luiz** (os *journals* não são os mesmos sem você!), à **Paty** (sempre tão amiga e otimista), à **Sandra** (sempre por perto, e pronta para uma **longa** conversa), à **Silvana** (organização impecável! Quem sabe um dia eu fique assim...), à **Déa** (nossa querida chefe);

À **Salete**, sempre carinhosa e amiga. Obrigada pela força e pelo estímulo!!!!

À **Klaysa**, mesmo de longe, obrigada pelo apoio e amizade;

Ao **Johnny**, por todas as ajudas com o computador. Elas foram fundamentais!!!!

À **Eugênia**, ao **Emerson** e à **Cinthia**, por estarem sempre prontos a ajudar, e pelo carinho;

À **Marilza** e à **Ellen** por contribuírem com a animação do Laboratório;

Ao “povo do Luiz”: **Rodrigo** (pelas discussões e atenção), **Simone**, **Wallace**, **Robson**, **Cristina**, **Ana Cristina** e **Adalberto** pelos momentos que passamos juntos;

Ao **grupo de T. cruzi**: **Désio**, **Juju**, **Dani**, **Eliane**, **Elizângela** e **Luciana** por tornarem os experimentos possíveis;

À **Sueli**, pelo apoio técnico e pelas ajudas com as “xerox”;

Àqueles que passaram por aqui e deixaram saudades: **Therezinha**, **Valéria**, **Renata Pretty** e **Denise Figueiras**;

Àqueles que nos bastidores possibilitam o bom funcionamento do Laboratório: “seu” **Paulinho**, **Valmir**, **Celso**, **D. Marilene**, **D. Lucinda** e a doce **D. Maria**;

Aos vizinhos de laboratório: **Aline, Sílvia, Graziela, Fábio, Léo, Cláudia e Dalton**, pelo apoio e pelo carinho;

Ao povo da secretaria: **Silvinha, Ivone, Ricardo e Luana**;

Ao professor **Pedro Cabello** pela ajuda com as análises estatísticas;

À **Andréa Henriques** e à **Bianca** pelas inúmeras ajudas e dicas com as “colunas” e pelo carinho;

Ao **Bruno** pela boa-vontade e pelas ajudas com as imagens;

Ao pessoal da pós-graduação: **Eliete, Fabíola, Dalton, Cleide e Kátia** por estarem sempre dispostos a resolver os meus problemas;

Ao **Marcílio**, sempre prestativo e pronto para “salvar” o meu computador!! Obrigada por ter “salvo” a minha tese algumas vezes!!

Ao Professor **Vivaldo Moura-Neto** pela forma como me recebeu em seu laboratório e pelos momentos de discussão;

À **Luciana Romão**, pela importante contribuição neste trabalho, e por tornar agradáveis nossos longos experimentos (mesmo quando estes foram realizados até “altas horas” da noite!!). Ao pessoal do “laboratório do professor Vivaldo” pelo carinho com que sempre me recebem;

Ao **Garcia** pelas dicas e ajuda na reta final desta tese;

À banca examinadora deste trabalho;

E, finalmente, a todos os meus amigos “extra-laboratório” que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Interações Imunoneuroendócrinas	15
1.2. A Doença de Chagas	21
1.3. Interações entre matriz extracelular e células do sistema imune	37
1.4. Expressão de ligantes e receptores de matriz no sistema nervoso central	39
1.5. Objetivos	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Animais	44
2.2. Cultivo de células neuronais	44
2.3. Protocolos de infecção	46
2.4. Anticorpos e sistemas de revelação	47
2.5. Imunocitoquímica	49
2.6. Avaliação dos percentuais de infecção	50
2.7. Detecção de componentes da matriz extracelular	51
2.8. Obtenção de sobrenadantes de culturas infectadas e de meio axênico de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
2.9. Análise do ciclo celular em cultivos de células N2a	52
2.10. Detecção de apoptose em células neuronais	53
2.11. Preparação de esplenócitos enriquecidos em células T	53
2.12. Adesão de linfócitos à linhagem N2a	54
2.13. Avaliação citofluorimétrica do fenótipo dos esplenócitos aderidos	55
2.14. Participação da matriz extracelular na adesão de linfócitos T às células N2a	56
2.15. Avaliação estatística	57
3. RESULTADOS	58

3.1. Infecção <i>in vitro</i> de células do sistema nervoso central pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
3.2. Características gerais das células neuronais após infecção <i>in vitro</i> pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
3.3. A infecção <i>in vitro</i> pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> modula a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular	62
3.4. A infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> aumenta a adesão de linfócitos T sobre células neuronais	66
3.5. A adesão de linfócitos T sobre células neuronais é mediada por interações envolvendo matriz extracelular	68
3.6. Modulação de receptores de matriz extracelular em esplenócitos, após adesão a células N2a	71
5. DISCUSSÃO	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ABREVIACOES E SIGLAS

ACTH – hormônio adenocorticotrfico

APC – célula apresentadora de antígeno

CD – ‘cluster of differentiation’ ou grupo de diferenciação

CÉLULAS NK – células “natural-killer”

CRH – corticotrofina

CY – “cychrome”

DNA – cido desoxirribonucléico

ECM – matriz extracelular

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FSC – “foward scatter”

HPA – hiptalamo-hipófise-adrenal

GH – hormônio do crescimento

IA – ndice de adesão

Ig – imunoglobulina

IGF-1 – fator de crescimento semelhante  insulina

IFN – interferon

IL – interleucina

MHC – complexo principal de histocompatibilidade

PCR – reação de polimerase em cadeia

PE – ficoeritrina

PGE – prostaglandina E

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

SSC – “side scatter”

TCR – receptor de célula T

Tdt – deoxinucleotidil transferase terminal

TGF- β – fator de crescimento transformador- beta

TNF – fator de necrose tumoral

VIP – peptídeo intestinal vasoativo

VLA – antígeno de aparecimento tardio

Interações Linfócitos/células nervosas, *in vitro*, na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: possível participação da matriz extracelular.

RESUMO

A Doença de Chagas, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma parasitose endêmica que acomete mais de 18 milhões de indivíduos na América Latina. Uma parte destes apresenta acometimento do sistema nervoso central e periférico. Vem sendo descrito, durante a fase aguda da doença, um intenso infiltrado inflamatório em regiões do tecido nervoso. Entretanto, os mecanismos envolvidos no aporte de células T e nas interações celulares neste tecido permanecem pouco esclarecidos. Assim, utilizamos neste trabalho um modelo *in vitro* visando a estudar as interações entre células T de camundongos na fase aguda de infecção e células neuronais, exemplificadas por uma linhagem de neuroblastoma murino (N2a), e por neurônios do córtex cerebral oriundos de cultivo primário. Em particular, procuramos avaliar as interações mediadas por elementos de matriz extracelular (ECM), os quais sabidamente são capazes de interferir com os eventos de migração celular.

Inicialmente, observamos que células N2a e neurônios de cultivo primário expressam constitutivamente proteínas de ECM (laminina, fibronectina e colágeno tipo IV), cuja presença é aumentada na vigência de infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*.

Também pudemos notar aumento na adesão de células T as células N2a quando estas são infectadas *in vitro* e/ou quando os linfócitos T são oriundos de animais infectados. Este fenômeno é mediado, pelo menos em parte, por elementos de ECM, visto que pôde ser bloqueado por anticorpos anti-fibronectina, anti-laminina e anti-colágeno tipo IV.

Nossos resultados indicam, assim, que ligantes e receptores de ECM encontram-se envolvidos na interação células T/células neuronais, a qual pode ocorrer após infecção experimental pelo *T. cruzi*.

***In vitro* lymphocyte/nervous cell interactions in *Trypanosoma cruzi* experimental infection: a possible role for the extracellular matrix.**

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is an endemic parasitic disease affecting more than 18 million individuals in Latin America. Part of these patients develop symptoms related to the disorders in the peripheral and central nervous system. It has been described, during the acute phase of the disease, an intense inflammatory infiltrate in the nervous tissue, but the mechanism(s) driving T cells to this tissue remain(s) to be clarified. We used an *in vitro* model to study the interactions between T cells derived *T. cruzi*-infected mice and neurons, herein exemplified by the N2a murine neuroblastoma cell line, as well as by a brain cortex-derived primary culture of murine neurons. In particular, we looked for extracellular matrix (ECM)- mediated interactions, known to affect T cell migration.

We first showed that N2a cells and the primary cultures of neurons constitutively express the ECM proteins, laminin, fibronectin and collagen type IV and that such an expression is upregulated upon *T. cruzi* infection *in vitro*.

Moreover, adhesion of peripheral T cells was enhanced (as compared to non- infected conditions) when N2a cells were infected *in vitro*, or when T cells were derived from *T. cruzi* infected mice. This likely represents an ECM- mediated event since it could be partially inhibited with anti-ECM antibodies.

In conclusion, our results indicate that ECM ligands and receptors are involved in the T cell/neuronal interactions that may occur following *T. cruzi* infection.

1. INTRODUÇÃO

As interações celulares entre o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) parecem desempenhar papel relevante na manutenção da homeostasia. Entretanto, em diversas condições patológicas este equilíbrio pode ser quebrado, acarretando uma série de conseqüências para o organismo.

Além das interações já bem conhecidas, como aquelas mediadas pela ligação entre o receptor de células T no linfócito e o complexo principal de histocompatibilidade na célula-alvo, outros mecanismos moleculares poderiam governar tais interações. Um deles poderia envolver os componentes da matriz extracelular (ECM) e seus receptores, sabidamente importantes nos processos de migração linfocitária. Nesse sentido, sabe-se que a expressão de ECM no SNC encontra-se alterada no curso da Doença de Chagas.

É neste contexto que inserimos nosso trabalho, onde procuramos investigar se a infecção experimental pelo *T. cruzi* poderia acarretar uma modulação da expressão de ECM por células nervosas, e como uma possível alteração destas moléculas poderia interferir com interações entre as células do sistema imune e células do SNC, particularmente aquelas mediadas por ligantes e receptores de ECM.

No entanto, antes de discutirmos nossos resultados, optamos por introduzir uma série de dados, que, a nosso ver, facilitarão a compreensão geral de nosso trabalho.

1.1. Interações Imunoneuroendócrinas

Atualmente, já é bem estabelecida na literatura a existência de uma interação bidirecional entre o sistema imune e o eixo neuroendócrino. Neste contexto, o sistema imune pode sofrer influência direta do sistema nervoso através de suas inervações e/ou ser influenciado por hormônios liberados na corrente sanguínea em conseqüência de uma

interação neuroendócrina envolvendo o hipotálamo, a hipófise e outras glândulas endócrinas.

Conforme detalhado abaixo, as evidências a respeito das chamadas interações imunoneuroendócrinas surgiram a partir de um conjunto de observações: a) receptores para citocinas, hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos são compartilhados por células dos sistemas imune, endócrino e nervoso; b) substâncias produzidas por estes sistemas coexistem em tecidos nervoso, endócrino e linfóide; c) mediadores provenientes do sistema imune são capazes de modular a função do sistema neuro-endócrino e vice-versa (revisado por Besedovsky e Del Rey, 1996).

1.1.1. Interações entre o sistema imune e o sistema endócrino.

Foi demonstrado que citocinas como interleucina-6 (IL-6), IL-1, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-2 e interferon- γ (IFN- γ) são capazes de modular a função hipofisária (revisado por Savino *et al*, 1999), tendo sido também evidenciada a existência de receptores para diversas citocinas em glândulas como adrenal, tireóide, pâncreas, testículos e ovários (revisado por Besedovsky e Del Rey, 2001), sugerindo que estas glândulas também possam estar sendo influenciadas por citocinas classicamente produzidas pelo sistema imune.

Por outro lado, sabe-se que células do sistema imune também expressam receptores para diversos hormônios, como por exemplo, corticosteróides, hormônios sexuais, hormônio do crescimento, prolactina, insulina e triiodotironina (revisado por Ashwell *et al*, 2000; Savino e Dardenne, 2000; Besedovski e Del Rey, 2001).

A existência de receptores hormonais em células do sistema imune poderia sugerir que hormônios provenientes do sistema endócrino poderiam estar interferindo com a atividade do sistema imune. Por exemplo, foi observado que hormônios hipofisários são capazes de aumentar a expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular em células epiteliais tímicas e conseqüentemente propiciar uma maior interação entre estes elementos e os timócitos (revisado em Savino e Dardenne, 2000; Savino et al, 2002).

Por outro lado, verificou-se que hormônios tímicos, tais como timulina, timosina $\alpha 1$, a timopoiatina e o fator humoral tímico $\gamma 2$, são capazes de interagir com células hipotalâmicas e hipofisárias, modulando a secreção de hormônios e de neuropeptídeos, podendo inclusive (no caso da timulina) modular hiperalgesia (Savino e Dardenne, 2000). Além disso, hormônios tidos anteriormente como de secreção exclusiva do sistema endócrino podem ser produzidos por células do tecido linfóide. Dentre estes, destacam-se o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a β -endorfina, o hormônio do crescimento e a prolactina (Savino et al, 1999). Foi demonstrado ainda que o sistema endócrino é capaz de sintetizar substâncias classicamente produzidas pelo sistema imune, como as citocinas. Dentre estas, pode-se citar a produção de IL-1, IL-2 e IL-6 por células hipofisárias de camundongos e ratos (Besedovsky e Del Rey, 2001).

1.1.2. Interações entre o sistema imune e o sistema nervoso.

As primeiras evidências de uma interação direta entre os sistemas nervoso e imune advém de observações anatômicas, quando foi evidenciado que fibras do sistema nervoso inervavam órgãos linfóides primários e secundários. Posteriormente, observou-se que tais inervações não se encontravam restritas às regiões adjacentes aos vasos sanguíneos no

interior destes órgãos, mas eram também observadas ao longo do parênquima destes. Estas evidências sugeriam que o sistema nervoso poderia interferir com a atividade do sistema imune de duas maneiras: controlando o fluxo celular através da regulação motora dos vasos, e agindo diretamente em células do sistema imune (revisado em Elenkov *et al.*, 2000).

A detecção de noradrenalina no interior de órgãos linfóides primários e secundários fez com que essa molécula fosse inicialmente apontada como o principal neurotransmissor liberado nos tecidos linfóides (revisado por Elenkov *et al.*, 2000).

Observou-se também que a inervação noradrenérgica nestes tecidos parece ser regional e específica: zonas com predomínio de células T, macrófagos e plasmócitos são intensamente inervadas, quando comparadas às regiões onde há predomínio de células B (Felten *et al.*, 1985).

A hipótese de que a noradrenalina pudesse interagir com células do sistema imune foi confirmada através da detecção de receptores β 2-adrenérgicos na superfície de linfócitos B, células *natural killer* (NK), células dendríticas, linfócitos Th0 e Th1 (Sanders *et al.*, 1997; Ramer-Quinn *et al.*, 1997; Kohm & Sanders, 1999).

Atualmente sabe-se que o sistema nervoso, através da inervação noradrenérgica, é capaz de interferir com a fisiologia do sistema imune, participando nos processos de hematopoiese, diferenciação intratímica de timócitos e ativação linfocitária (revisado por Elenkov *et al.*, 2000).

No que diz respeito à ativação linfocitária, acreditava-se que a noradrenalina era capaz de induzir preferencialmente uma resposta do tipo 1. Entretanto, estudos recentes sugerem que a ação da noradrenalina na ativação das células T estaria relacionada com o momento

em que ocorre a exposição a este neurotransmissor (Swanson *et al.*, 2001). Assim, foi sugerido que uma célula T CD4⁺ “naive”, ao ser ativada na presença de noradrenalina, se diferenciaria em célula Th1, capaz de produzir elevada quantidade de IFN- γ . Por outro lado, uma célula já diferenciada em Th1 e posteriormente exposta à noradrenalina passaria a ter sua produção de IFN- γ diminuída (Swanson *et al.*, 2001).

Uma das evidências de interações entre o sistema imune e o sistema nervoso parassimpático é a existência de receptores muscarínicos na superfície de timócitos (Gordon *et al.*, 1978; Hadden, 1977; Maslinski *et al.*, 1988, Strom *et al.*, 1977), os quais poderiam sofrer influência da acetilcolina no próprio timo, ou em sítios periféricos.

Entretanto, estudos demonstrando a presença de fibras colinérgicas no timo ainda são controversos, e acredita-se que a inervação colinérgica neste órgão seja mínima, quando comparada à inervação noradrenérgica (Ader *et al.*, 2001).

Em relação aos órgãos linfóides secundários, foi detectada a existência de acetilcolinesterase em fibras nervosas no interior de linfonodos (Bellinger *et al.*, 1985). Entretanto, ainda permanece em estudo se estas fibras são realmente colinérgicas, e como poderiam estar influenciando na fisiologia do sistema imune.

Além de ser influenciado pelos neurotransmissores clássicos, noradrenalina e possivelmente acetilcolina, vem sendo demonstrado que o sistema imune também sofre a influência de neuropeptídeos como a substância P e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que *in vitro* são capazes de interferir com a produção de IL-2 por células T (Nagano *et al.*, 1994; Maggiano *et al.*, 1994). Além disso, vem sendo evidenciada a presença de neuropeptídeo Y em órgãos linfóides (Lundberg *et al.*, 1988; Weihe *et al.*, 1989; Weihe *et al.*, 1991).

Por outro lado, sabe-se que hormônios e citocinas produzidas pelo sistema imune também são capazes de interferir com a atividade do sistema nervoso em condições fisiológicas e patológicas. Neste contexto foi demonstrado que IL-5, IL-7, IL-9 e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) encontram-se envolvidos na regulação da diferenciação neuronal, e que IL-2 e IL-6 são capazes de alterar, *in vitro*, o padrão de secreção do hormônio de liberação de corticotrofina (CRH) por neurônios hipotalâmicos (Arzt *et al.*, 1993).

Em condições patológicas, citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são capazes de interagir com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) modulando a produção de catecolaminas e glicocorticóides (revisado por Rivest, 2001).

Foi demonstrado que IL-1 β é capaz de interagir com células da barreira hematoencefálica e induzir a produção de prostaglandina-E2, a qual se difunde para o parênquima cerebral sendo capaz de induzir febre, estimular fibras do sistema nervoso simpático, e induzir a transcrição e produção de CRH, o que conseqüentemente culmina com a ativação do eixo HPA, produção de glicocorticóides e modulação da resposta inflamatória (revisado por Rivest, 2001).

Acredita-se que IL-6 e TNF- α possuam mecanismo de ação semelhante ao da IL-1 β , e que IL-6 seja capaz de estimular diretamente a síntese de CRH e o eixo HPA (revisado por Rivest, 2001).

Além desta interação bidirecional entre estes sistemas, em que neuropeptídeos produzidos pelo sistema nervoso são capazes de interferir na fisiologia do sistema imune, e citocinas sintetizadas por este são capazes de interferir na atividade do sistema nervoso, sabe-se que o sistema imune também é capaz de secretar neuropeptídeos, assim como o

sistema nervoso é capaz de produzir citocinas (Ader et al., 2001). Tendo em vista este conceito, pode-se facilmente imaginar que desvios patológicos em um desses sistemas poderiam afetar o outro.

1.2. A Doença de Chagas

A doença de Chagas, antroponose também conhecida como tripanosomíase americana, constitui ainda hoje um grave problema de saúde pública para vários países da América do Sul e América Central. Estima-se a existência de 18 a 20 milhões de indivíduos infectados (OMS, 2002).

Sabe-se que esta doença é amplamente distribuída no continente americano, predominando principalmente em regiões da Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e Venezuela, locais onde o precário nível sócio-econômico de algumas áreas endêmicas favorece a domiciliação do vetor da doença. No Brasil, as maiores taxas de prevalência são observadas no Rio Grande do Sul (sudeste e noroeste), em parte de São Paulo (nordeste e região de Sorocaba), Minas Gerais (Triângulo Mineiro, oeste, norte e Jequitinhonha), Goiás, sul de Tocantins, e alguns estados do Nordeste, especialmente Paraíba, Pernambuco, Piauí e Ceará (Corrêa *et al.*, 1996).

A doença de Chagas apresenta como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado descrito inicialmente por Carlos Chagas no início do século passado, pertencente à família *Trypanosomatidae* e ao subgênero *Schizotrypanum*. A transmissão deste parasita a hospedeiros vertebrados ocorre através de um vetor invertebrado, um inseto hematófago pertencente à família *Reduviidae* e à subfamília *Triatomina* (Siqueira-Batista *et al.*, 1996).

Após a ingestão de sangue contaminado com tripomastigotas sanguíneos pelo vetor, o parasita passa por uma série de alterações que culminarão com a conversão do tripomastigota em epimastigota. Uma vez que estas formas atingindo o intestino posterior, irão se transformar em tripomastigotas metacíclicos, processo denominado metaciclogênese.

Durante o ato da sucção do sangue de vertebrados, os vetores depositam na pele, próximo ao local da solução de continuidade recém-formada, as formas tripomastigotas metacíclicas juntamente com as fezes. Ao coçar a região irritada pela picada do vetor, o indivíduo leva formas tripomastigotas metacíclicas para a intimidade da pele, as quais posteriormente irão atingir a corrente sanguínea e entrar em contato com células do sistema mononuclear fagocitário .

Após o contato e conseqüente invasão destas células, o parasita passa à forma amastigota (intracelular), capaz de se replicar no interior das células hospedeiras. Posteriormente, ainda no interior celular, ocorre a transformação de formas amastigotas em formas tripomastigotas, as quais rompem as células infectadas e atingem a circulação sanguínea, podendo infectar novas células deste hospedeiro ou serem sugadas juntamente com o sangue por um vetor. Desta forma, o ciclo de transmissão do *T. cruzi* é mantido (Siqueira-Batista *et al.*, 1996).

Além da via de transmissão vetorial, também pode-se destacar como formas de transmissão do parasita a transfusão sanguínea, o transplante de órgãos, a infecção por acidentes em laboratórios e a via transplacentária (revisado por Tafuri, 1987).

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* depende de diferentes características relacionadas ao parasita, envolvendo o tropismo da cepa infectante, os constituintes antigênicos, a carga

parasitária inoculada, a morfologia, a virulência e a patogenicidade. Depende, ainda, de características relacionadas ao hospedeiro, como, por exemplo, a constituição genética, a resistência natural e a resposta imune. No seu conjunto, esses fatores determinam a intensidade com que esta patologia irá se desenvolver, modulando direta ou indiretamente as fases da doença.

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas clássicas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença de tripomastigotas no sangue periférico do indivíduo infectado, além de um considerável parasitismo tecidual (revisado por Andrade, 1991), e pode apresentar-se de forma assintomática ou oligossintomática, ou através de manifestações clínicas que envolvem febre, taquicardia, esplenomegalia e adenomegalia. Em menos de 50% dos indivíduos na fase aguda da infecção, pode-se observar a presença de edema bipalpebral unilateral (sinal de Romanã) que, juntamente com o chagoma cutâneo (lesão focal, nodular, arroxeadada e endurecida em regiões da pele), representam a porta de entrada dos parasitas, e habitualmente são acompanhados por uma adenite satélite (Andrade & Andrade, 1998).

A fase crônica pode apresentar-se em uma forma indeterminada, encontrada em indivíduos assintomáticos, sem alterações cardíacas observáveis no eletrocardiograma e sem alterações do trânsito do tubo digestivo. Entretanto, esses indivíduos apresentam evidências parasitológicas e/ou sorológicas de infecção pelo *T. cruzi*.

A fase crônica pode ainda apresentar-se com manifestações clínicas, caracterizadas por lesões em alguns órgãos e presença de mega-síndromes, a despeito de uma baixa parasitemia. Neste contexto, o coração é um dos órgãos mais afetados pela doença, ocorrendo também um importante comprometimento do trato gastrointestinal e do

sistema nervoso, independente do tropismo diferencial apresentado pela cepa de *T. cruzi* envolvida na infecção.

As principais manifestações clínicas observadas na fase crônica estão relacionadas com o coração e com o trato gastrointestinal. Estima-se que 27% dos pacientes nesta fase apresentem alguma sintomatologia cardíaca, enquanto que 6% e 3% podem apresentar sintomas relacionados ao trato gastrointestinal e ao sistema nervoso, respectivamente (OMS, 2002).

1.2.1. O Sistema Imune na Doença de Chagas

Um dos aspectos relativos à resposta imune na doença de Chagas refere-se à imunidade inata. Nesse contexto, postulou-se que formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* seriam capazes de induzir uma resposta imune inata, estimulando a síntese de citocinas como IL-12, TNF- α e IL-1 β por macrófagos, o que conseqüentemente seria capaz de ativar células NK que por sua vez produziriam IFN- γ aumentando ainda mais a ativação dos macrófagos (Gazzinelli e Brener, 1997).

Conforme já é bem estabelecido na literatura, estas citocinas produzidas pela resposta imune inata na fase inicial da infecção são capazes de ativar preferencialmente uma resposta do tipo I em relação a uma resposta do tipo II, o que é de fundamental importância para o controle da parasitemia durante a fase aguda.

Ainda em relação à importância da resposta imune no controle da parasitemia após a infecção experimental pelo *T. cruzi*, diversos grupos demonstraram a participação de macrófagos, células NK e IFN- γ (Torrico *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1993).

No que diz respeito à resposta imune adaptativa, foi observado que as células T CD8⁺ são as principais envolvidas na contenção da multiplicação parasitária, uma vez que o *T. cruzi* apresenta multiplicação citossólica e é classicamente apresentado via MHC de classe I. Entretanto, foi demonstrado que animais deficientes em células T CD4⁺ apresentam níveis elevados de parasitas circulantes e teciduais, sendo estes níveis comparáveis aos observados em animais que apresentam deleção do gene de β_2 -microglobulina. Isto sugere que os linfócitos T CD4⁺ Th1, preferencialmente ativados pelo parasita, sejam de fundamental importância para a ativação das células T CD8⁺, principalmente através da produção de IL-2 e IFN- γ (revisado por Brener e Gazzinelli, 1997).

Foi ainda evidenciada importante participação de anticorpos específicos contra o *T. cruzi*, tanto no controle da parasitemia na fase inicial da doença, quanto na manutenção dos baixos níveis de parasita durante a fase crônica (revisado por Umekita e Mota, 2000; Krautz *et al.*, 2000). Neste contexto, observou-se que a forma tripomastigota do *T. cruzi* apresenta, em sua superfície, algumas glicoproteínas capazes de inibir a ativação do sistema complemento e conseqüentemente a lise do parasita, sendo a ativação do complemento dependente da interação parasita-anticorpo (Krautz *et al.*, 2000).

Sabe-se que a fase aguda da infecção pode ser caracterizada por uma série de alterações no sistema imune. Dentre estas, destaca-se a ativação policlonal de linfócitos B e T envolvendo principalmente os fenótipos CD5⁺ e TCR $\gamma\delta$ ⁺, respectivamente (Minóprio *et al.*, 1986b, 1989). Considerando-se que tais fenótipos se encontram associados a doenças autoimunes (Marcos *et al.*, 1988), alguns autores sugeriram que a ativação policlonal inespecífica poderia favorecer o aparecimento das lesões observadas em alguns órgãos

durante a fase crônica da doença. Contudo, os mecanismos envolvidos no processo de ativação policlonal ainda não estão bem estabelecidos. Neste contexto, foi evidenciado que glicoinositolfosfolipídios presentes na superfície da forma tripomastigota do *T. cruzi* são capazes de ativar linfócitos B de forma inespecífica e induzir a produção de IgM, IgG1 e IgG3 (Bento *et al.*, 1996). Além disso, demonstrou-se o envolvimento de uma proteína presente no parasita (TcPA 45) com a ativação policlonal de células B (Reina-San-Martin *et al.*, 2000b).

Em conjunto, esses dados sugerem que o parasita, por si só, exerceria uma ação mitogênica sobre os linfócitos B. No entanto, foi demonstrado experimentalmente que a depleção de células T CD4 é capaz de impedir esta ativação policlonal, indicando a participação deste tipo celular neste processo (Minóprio *et al.*, 1986b).

Outro fenômeno observado durante a fase aguda da infecção diz respeito a uma marcante imunossupressão humoral e celular, o que, para alguns autores, é conseqüência da ativação policlonal (Minóprio *et al.*, 1989).

Ainda em relação ao sistema imune, foram descritas alterações em órgãos linfóides primários e secundários. No timo de animais infectados por exemplo, foi observada uma severa atrofia na região cortical, acompanhada de depleção de células CD4⁺CD8⁺ (Savino *et al.*, 1989; Leite- de- Moraes *et al.*, 1991; Martins *et al.*, 1994). Foram também observadas algumas alterações funcionais caracterizadas por aumento na atividade citotóxica inespecífica de timócitos, diminuição da resposta proliferativa e possível distúrbio na migração e diferenciação intratímica de células T (Leite de Moraes *et al.*, 1994; Cotta de Almeida *et al.*, 2001). Além disso, formas amastigotas foram detectadas no parênquima deste órgão (Savino *et al.*, 1989).

No que diz respeito aos órgãos linfóides secundários, foi observado por Minóprio e colaboradores (1989) aumento no tamanho e no número de células dos linfonodos subcutâneos e do baço, possivelmente relacionado ao processo de ativação policlonal. Porém, foi mostrado em nosso Laboratório que linfonodos mesentéricos sofrem atrofia (De Meis, 1998). Além disso, existe uma alteração no repertório de células T nos órgãos linfóides periféricos (Leite de Moraes *et al.*, 1994), o que talvez decorra de um escape de células imaturas do timo (Mendes-da-Cruz, 2000).

Também foram descritas alterações em ligantes e receptores de ECM nos órgãos linfóides secundários durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*, tendo sido observado aumento na expressão de fibronectina, laminina e de seus receptores em regiões do parênquima do baço e linfonodos, e aumento na expressão de VLA-4, VLA-5 e VLA-6 na superfície de linfócitos obtidos de órgãos linfóides periféricos, sendo este aumento predominante em linfócitos T CD8⁺ (Lima-Quaresma, 1999).

1.2.2. Autoimunidade na Doença de Chagas

A idéia inicial de que um componente autoimune pudesse estar envolvido na fisiopatologia da Doença de Chagas foi baseada em dados experimentais que demonstraram que anticorpos circulantes provenientes de pacientes e camundongos na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* são capazes de reconhecer especificamente antígenos oriundos do coração. Posteriormente, também foi visto que linfócitos T capazes de reconhecer antígenos do tecido cardíaco e nervoso são observados em camundongos e pacientes chagásicos (revisado por Kierszenbaum, 1999). Entretanto ainda não se sabe de forma conclusiva se os fenômenos autoimunes observados seriam desencadeados pelo

parasita, e posteriormente afetariam antígenos próprios como consequência de um mimetismo molecular, ou se seriam desencadeados diretamente por antígenos próprios apenas expostos ao sistema imune após uma lesão tecidual gerada pelo parasita.

No que diz respeito à existência de um mimetismo molecular entre antígenos próprios do hospedeiro e o *T. cruzi*, foi demonstrado que células T obtidas de lesões cardíacas de pacientes com miocardiopatia durante a fase crônica da infecção são capazes de responder, *in vitro*, ao estímulo com miosina humana (cadeia pesada) e com a proteína B13 do parasita (Cunha-Neto *et al.*, 1996a). Posteriormente, este mesmo grupo demonstrou que células T obtidas de pacientes normais são capazes de responder à miosina cardíaca quando sensibilizadas previamente, *in vitro*, com a proteína B13 do *T. cruzi* (Abel *et al.*, 1997). Desta forma, estes autores propuseram que durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*, poderia ocorrer a sensibilização de clones de células T CD4⁺ circulantes mediante o reconhecimento de antígenos da proteína B13 do parasita. Posteriormente, ao circular pelo tecido cardíaco, esta população celular seria ativada por macrófagos apresentando a miosina cardíaca, o que propiciaria o desenvolvimento das lesões teciduais observadas durante a fase crônica da doença.

Por outro lado, a existência de uma ativação policlonal mediada por antígenos do parasita, conforme será posteriormente abordado, poderia ativar clones de linfócitos T e B autorreativos capazes de reconhecer antígenos próprios (revisado por Minóprio, 2001).

Neste contexto, o parasitismo tecidual e a presença de uma resposta inflamatória contra antígenos do parasita poderiam induzir a expressão de moléculas co-estimulatórias e possibilitar a apresentação de antígenos do próprio organismo (revisado por Reina-San-Martin *et al.*, 2000a).

Alguns estudos vêm sendo realizados a fim de melhor compreender os possíveis mecanismos de autoimunidade que poderiam estar envolvidos nas lesões observadas durante a fase crônica da infecção. Desta forma, foi proposto um modelo experimental onde o coração de camundongos isogênicos neonatos são transplantados na orelha de camundongos adultos. Foi observado que em camundongos normais, os transplantes permaneciam viáveis por longo período. Entretanto, quando o camundongo receptor era cronicamente infectado pelo *T. cruzi*, observou-se severa rejeição do coração transplantado. Além disso, foi verificado que a transferência de células T CD4⁺, obtidas de camundongos na fase crônica da infecção, para a região adjacente ao transplante singênico em camundongos não-infectados foi capaz de desencadear um processo de rejeição nos corações transplantados (Ribeiro dos Santos *et al.*, 1992; Silva-Barbosa *et al.*, 1997), sugerindo que este tipo celular seria capaz de reconhecer de forma cruzada antígenos do parasita e antígenos presentes no tecido cardíaco.

Entretanto, Tarleton *et al.* (1996) discordaram desses achados, sustentando a hipótese de que uma inflamação grave ocorre somente quando o parasita está presente no transplante, mostrando que o *T. cruzi*, e não um processo autoimune, seria responsável pelo efeito observado nos experimentos com o coração transplantado de camundongo neonato.

Contestando esta hipótese, e favorecendo a idéia do envolvimento de fenômenos autoimunes como um dos responsáveis pelas lesões observadas durante a fase crônica da infecção, é o fato de que em alguns órgãos a persistência do parasita não é o suficiente para causar um processo inflamatório. Além disso, foi obtido a partir de um camundongo infectado pelo *T. cruzi*, um clone de células T CD4⁺ capazes de rejeitar transplante cardíaco singênico (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2001).

Em relação à participação de fenômenos de autoimunidade como um dos envolvidos na gênese das lesões observadas no sistema nervoso durante a Doença de Chagas, alguns trabalhos demonstraram a presença de células mononucleares em infiltrados inflamatórios nas meninges, leptomeninges e espaços perivasculares (revisado por Pittella, 1993; Prata, 1994), inclusive na ausência de ninhos de parasitas. Corroborando esta hipótese, foi demonstrado a existência de uma família de proteínas, localizada na superfície do flagelo do parasita, cuja seqüência em sua região carboxiterminal apresenta um mimetismo com o tecido nervoso de mamíferos (Van Voorhis *et al*, 1993). Neste contexto, foi evidenciado que anticorpos contra tais proteínas são capazes de reagir de forma cruzada com uma proteína presente no axônio e também com células do plexo mioentérico (Van Voorhis e Eisen, 1989).

Outros autores também observaram fenômenos autoimunes no sistema nervoso durante a infecção pelo *T. cruzi*: células T CD4⁺ reconhecem de forma cruzada antígenos do parasita e componentes do sistema nervoso central em estudos de resposta proliferativa, e anticorpos reconhecendo estruturas de neurônios, células da glia, componentes da bainha de mielina, no sangue de pacientes e modelos experimentais de infecção pelo parasita (Lopes e Ribeiro-dos-Santos, 1979; Chaves *et al.*, 1993; Spinella *et al.*, 1992).

Entretanto, diversos estudos sugerem que a persistência do parasita durante a fase crônica seria responsável pelas lesões observadas durante esta fase da infecção. A perpetuação do *T. cruzi* no organismo dos indivíduos com lesões em órgãos-alvo como coração, trato gastrointestinal e sistema nervoso, poderia estar relacionada à carga parasitária inoculada, à virulência da cepa e à eficiência da resposta imune contra o parasita durante a fase aguda da infecção. Tarleton *et al.* (2000), por exemplo, empregando um modelo de

camundongos com deleção do gene de Stat6, o qual se encontra envolvido na via de sinalização intracelular de células T CD4⁺ Th2, relataram diminuição da severidade da doença na fase crônica, paralela à diminuição de parasitas observados no coração e tecidos musculares esqueléticos. Outros autores demonstraram haver uma associação entre uma maior carga de parasitas na fase crônica da infecção e um aumento relativo de células Th2 no infiltrado inflamatório observado nas lesões cardíacas (Reis et al, 1997).

Em estudo realizado em camundongos, foi demonstrado que durante a fase crônica da doença, há persistência do parasita nos tecidos onde são observadas as principais lesões desta fase, ou seja, coração, trato gastrointestinal e músculos esqueléticos (revisado por Tarleton e Zhang, 1999). Neste contexto, Jones e colaboradores (1993) utilizando cadáveres humanos, constataram que o DNA do parasita era detectado, através de PCR, nos tecidos cardíacos daqueles que apresentaram miocardiopatia durante a fase crônica da infecção, enquanto que o material genético do parasita não pôde ser detectado em tecidos cardíacos de pacientes sem miocardiopatia.

Estudos semelhantes realizados por Zhang e Tarleton em modelo murino na fase crônica da infecção também revelaram a existência de uma correlação entre a persistência do parasita e as lesões observadas nos tecidos analisados (1996). Corroborando estes estudos, Higuchi *et al.* (1993), analisando tecidos cardíacos de pacientes com doença de Chagas, demonstraram haver uma correlação entre a presença do parasita e um infiltrado inflamatório. Assim, os autores sugeriram que a existência de um infiltrado inflamatório em tecido cardíaco, e conseqüentemente o possível desenvolvimento de uma cardiomiopatia, seriam dependentes da presença do parasita ou pelo menos de parte deste.

Entretanto, ao analisarem fragmentos de tecidos cardíacos humanos, outros autores não conseguiram demonstrar correlação positiva entre a intensidade do infiltrado inflamatório e a presença do parasita, mesmo utilizando técnicas consideradas extremamente sensíveis (Olivares-Villagomez *et al.*, 1998; Palomino *et al.*, 2000).

1.2.3. Alterações no Sistema Nervoso observadas na Doença de Chagas

Em 1911, Vianna observou pela primeira vez o acometimento de células do sistema nervoso central, incluindo as regiões do cérebro, bulbo e medula espinhal, durante a fase aguda da Doença de Chagas. Posteriormente, Chagas e Villela em 1922 realizaram os primeiros estudos demonstrando que as alterações observadas durante a fase aguda da infecção não eram restritas ao sistema nervoso central (SNC), mas também acometiam o sistema nervoso periférico (SNP), autônomo, e gânglios entéricos.

Durante a fase aguda da doença estima-se que 10% dos pacientes desenvolvam uma forma severa de encefalite, sendo a maioria destes, crianças menores de 2 anos de idade (revisto por Pentreath, 1995). O falecimento destes pacientes ocorre em quase todos os casos, sendo resultante do próprio acometimento cerebral ou da miocardite chagásica aguda, geralmente intensa (Pittella, 1993).

Os achados histopatológicos observados no SNC durante a fase aguda da infecção, tanto em humanos como em modelos experimentais, incluem parasitismo em regiões do cérebro e medula espinhal, intenso infiltrado inflamatório nas meninges, leptomeninges e espaços perivascularares, aumento das leptomeninges, edema cerebelar e formação de nódulos contendo astrócitos, células da microglia, macrófagos e neutrófilos (Pittella, 1993; Prata, 1994; Da Matta *et al.*, 2000).

A intensidade da encefalite pode variar nos pacientes com a forma aguda assintomática ou leve, sendo observada apenas em focos esparsos, ou até mesmo inexistente. Já nos pacientes imunocomprometidos, a encefalite é geralmente muito mais grave, com tendência à necrose e à hemorragia (Queiroz, 1973; revisto por Pittlla, 1993).

Formas amastigotas do *T. cruzi*, descritas em regiões do SNC, podem ser observadas no interior de astrócitos, microglia e células endoteliais. Os neurônios são raramente parasitados, mas a presença de formas amastigotas no interior destas células foi descrita por alguns autores (Pittella, 1991 apud Vilela e Vilela, 1932; Tanowitz et al., 1982).

Embora raramente parasitados, os neurônios perdem sua morfologia típica e são destruídos por mecanismos relacionados, ou não, à presença do parasita. Em estudos utilizando cães como modelo experimental, foi demonstrado que os neurônios localizados próximos aos sítios inflamatórios são raramente parasitados, sendo a degeneração observada considerada inespecífica (Queiroz, 1975; Pittella et al., 1990).

É provável que a entrada do *T. cruzi* no SNC ocorra através de vasos sanguíneos. Entretanto, o acesso do parasita via líquido, provavelmente devido à uma lesão no plexo coróide, também é uma hipótese aceitável, e que é corroborada pela presença frequente de *T. cruzi* no líquido, inclusive em pacientes sem sintomas neurológicos (Hoff et al., 1978).

Pouco se sabe a respeito das lesões histopatológicas no SNC durante a fase crônica da infecção. De fato, o acometimento do SNC durante a fase crônica da doença ocorre raramente, e a reativação da infecção durante esta fase pode ocorrer (apesar de raramente) em pacientes imunocomprometidos. Recentemente foi demonstrada regressão do infiltrado inflamatório em regiões do SNC durante a fase crônica da infecção. Entretanto,

neste estudo os sintomas neurológicos observados predominantemente durante a fase crônica, não estavam relacionados à presença de encefalite. O predomínio dos sintomas durante esta fase da doença poderia ser explicado pelas lesões geradas durante a fase aguda, uma vez que todos os animais estudados desenvolveram encefalite durante esta fase. Desta forma, lesões geradas durante a fase aguda da infecção deixariam seqüelas, as quais se manifestariam durante a fase crônica (Silva et al., 1999a).

Por outro lado, as alterações no SNP durante a fase crônica são freqüentemente observadas, principalmente na inervação cardíaca e no plexo de Auerbach. Alterações anatômicas e fisiológicas foram demonstradas, tanto em modelos experimentais como em humanos, em fibras sensoriais periféricas, neurônios motores, gânglios espinhais e no nervo ciático (Losavio et al., 1993).

Apesar do acometimento do sistema nervoso ser descrito desde que a Doença de Chagas foi descoberta, os mecanismos envolvidos na gênese das lesões, e a extensão destas, ainda permanecem pouco esclarecidos. Alguns autores vêm propondo o envolvimento de mecanismos imunológicos. Corroborando esta hipótese, foi demonstrado que a transferência de células T, oriundas de camundongos na fase crônica da infecção, para camundongos não-infectados acarreta no desenvolvimento de lesões inflamatórias no SNC (Said et al., 1985; Hontebeyrie-Joskowicz et al., 1987). Também foram evidenciados anticorpos circulantes que reconhecem estruturas cerebrais e células de Schwann no SNP (Ribeiro-dos-Santos et al., 1979; Cossio et al., 1974; Khoury et al., 1979), durante as fases aguda e crônica da doença, além de componentes da bainha de mielina (Chaves et al, 1993; Spinella et al, 1992).

Conforme mencionado acima, um dos mecanismos propostos para o reconhecimento de estruturas do sistema nervoso durante a infecção pelo *T. cruzi* é a existência de um mimetismo molecular entre o parasita e antígenos do sistema nervoso. Desta forma, foi demonstrado por Petri e Van Voorhis (1991) mimetismo molecular entre diversos antígenos do *T. cruzi* e antígenos lipídicos e protéicos do tecido nervoso. Dentre os antígenos lipídicos foram descritos, neste trabalho, sulfolipídeos e sulfogalactoses, estando estes presentes apenas na mielina e células gliais.

Em relação aos antígenos protéicos foram descritas duas proteínas, de 25 e 160 kDa (F1-160, encontrada no flagelo do parasita), e que apresentam mimetismo molecular com uma proteína de 48 kDa presente no cérebro de camundongos e em axônios de nervos periféricos (Van Voorhis & Eisen, 1989).

Cabe ressaltar, que anticorpos capazes de reconhecer a proteína F1-160, presente no parasita, foram detectados em humanos e em modelos experimentais; já os anticorpos capazes de reconhecer a proteína de 25 kDa descrita, são capazes de gerar paralisia letal quando transferidos passivamente para camundongos não-infectados (Petri e Van Voorhis, 1991).

Corroborando a hipótese de que mecanismos autoimunes pudessem estar envolvidos nas lesões observadas no SNC, foi demonstrado que o infiltrado inflamatório detectado durante a fase aguda da infecção não se encontra necessariamente relacionado à presença de formas amastigotas e/ou antígenos do parasita (Silva *et al.*, 1999a). No entanto, não se pode afastar a hipótese de que antígenos do parasita não tenham sido detectados pelas técnicas utilizadas.

Pouco se sabe a respeito da natureza do infiltrado inflamatório observado no SNC, principalmente durante a fase aguda da infecção. Foi evidenciado que células T CD8⁺ predominam ao lado de macrófagos, estando as células T CD4⁺ em menor quantidade (Silva *et al.*, 1999a). Entretanto, os mecanismos envolvidos no aporte deste infiltrado celular ao sistema nervoso, assim como os mecanismos moleculares envolvidos nas interações entre células do sistema imune e células do sistema nervoso, durante a infecção pelo *T. cruzi*, permanecem pouco esclarecidos. Uma possibilidade seria a existência de interações mediadas por ECM, que sabidamente são relevantes na migração de leucócitos para sítios de inflamação (revisado por Vaday & Lider, 2000).

No que diz respeito à expressão dos ligantes e receptores de ECM no SNC durante a infecção pelo *T. cruzi*, foi demonstrado, em camundongos, um aumento da expressão de fibronectina e laminina nos espaços perivasculares, nas regiões da meninge, leptomeninge, plexo coróide e membrana basal dos vasos sanguíneos durante as fases aguda e crônica da infecção. Também foi observado um aumento da expressão de $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ integrinas nos vasos do tecido cerebral (Silva *et al.*, 1999b). Neste mesmo estudo, foi evidenciada a presença de células positivas para $\alpha 4$ -integrina e $\alpha 5$ -integrina no infiltrado inflamatório, as quais estavam localizadas próximas da fibronectina detectada nos espaços perivasculares, sugerindo uma participação de componentes da ECM, especialmente da fibronectina na entrada e migração celular no interior do parênquima cerebral.

Entretanto, não há estudos avaliando diretamente interações celulares, particularmente o evento de adesão, entre células do sistema nervoso e linfócitos de animais infectados pelo *T. cruzi*.

1.3. Interações entre matriz extracelular e células do sistema imune

Conforme mencionado anteriormente, a interação entre linfócitos e ECM é mediada principalmente por uma subfamília da família das integrinas.

As integrinas são proteínas transmembranares heterodiméricas, formadas por cadeias polipeptídicas (α e β) unidas entre si por ligações não-covalentes (revisado por Hynes, 2002). O sítio de ligação com as moléculas de ECM parece ser formado por sequências de ambas as subunidades, e o domínio citoplasmático das integrinas faz conexão com o citoesqueleto possibilitando uma sinalização intracelular (revisado por Ivaska & Heino, 2000).

Atualmente, vinte e quatro heterodímeros $\alpha\beta$, formados por oito diferentes cadeias β e dezoito subunidades α , são conhecidos, sendo que uma subunidade α pode se ligar a mais de uma subunidade β . Além disso, sabe-se que uma integrina pode se ligar a mais de um ligante de ECM (revisado por Ivaska & Heino, 2000).

Diversas integrinas estão envolvidas na interação entre diferentes tipos celulares e elementos de ECM. No que diz respeito aos linfócitos, foi demonstrado que os principais receptores envolvidos pertencem à subfamília $\beta 1$ (revisado por Hynes, 2002) também conhecida como VLA (do Inglês *very late antigen*). Nesta subfamília, diferentes cadeias α podem se unir à cadeia $\beta 1$, constituindo diferentes integrinas, as quais se ligam a diferentes componentes da ECM. Assim, foi demonstrado que os principais receptores de fibronectina expressos na superfície dos linfócitos T são o VLA-4 e o VLA-5 ($\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ integrinas, respectivamente). Já a integrina VLA-6 foi identificada como o principal receptor de laminina em linfócitos T humanos (Shimizu et al, 1990).

A interação entre ligantes e receptores de ECM é capaz de desencadear mecanismos de ativação intracelular que culminam com a modulação de diversas respostas biológicas. Nesse sentido, foi evidenciada a importância desta interação no processo de migração e diferenciação intratímica (revisado por Savino *et al*, 2000; Schmeissner, 2001), na indução de morte por apoptose de timócitos duplo-positivos no timo (Takayama *et al*, 1998), na ativação de células T CD4⁺ humanas (Yamada *et al*, 1991) e na migração de células T para tecidos específicos na periferia (de Sousa *et al*, 1991).

Além de interagir diretamente com células do sistema imune, os elementos de ECM são capazes de se ligar a diversas citocinas e quimiocinas, modulando desta forma a atividade linfocitária (revisado por Vaday e Lider, 2000). Neste contexto foi descrito que a ligação de quimiocinas à ECM é capaz de criar um gradiente de concentração fundamental para direcionar a migração linfocitária (Gilat *et al*, 1996; Líder *et al*, 1995, revisado por Epler *et al*, 2000), além de induzir a adesão de linfócitos T à fibronectina *in vitro* (Carr *et al*, 1996).

Cabe ressaltar que a expressão de integrinas na superfície dos linfócitos (e outros tipos celulares) é modulada através da interação com os elementos de ECM (Diamond & Springer, 1994; Shimizu & Hunt, 1996). Isto permite mudanças de avidéz e afinidade nas moléculas de integrina (Diamond & Springer, 1994; Bazzoni & Hemler, 1998), possibilitando uma interação dinâmica e controlada entre os linfócitos e o microambiente que os cerca.

1.4. Expressão de componentes de matriz extracelular no sistema nervoso central

Até 1962, a existência de ligantes e receptores de ECM no sistema nervoso era controversa. Embora já estivesse bem estabelecida a presença destes elementos em outras estruturas do organismo, alguns pesquisadores acreditavam que as células do sistema nervoso encontravam-se tão unidas, que não seria possível a existência de uma matriz entre elas (Horstmann, 1962). Atualmente, apesar de ainda serem relativamente poucos os estudos a este respeito, é sabido que a ECM está presente e desempenha importante função no SNC e SNP, incluindo diferenciação e proliferação celular, morfogênese e manutenção do funcionamento e da estrutura do sistema nervoso (Reichardt & Tomasseli, 1991; Venstrom & Reichardt, 1993; Gilat *et al*, 1996). Além disto, a ECM está envolvida na formação de sinapses, crescimento axonal e regeneração de neurônios danificados em decorrência de neoplasias e edemas cerebrais (Rutka *et al*, 1988).

A distribuição e a concentração dos elementos de ECM no SNC variam ao longo do desenvolvimento e durante a vida adulta. Assim, durante a ontogênese do SNC pode ser observada uma elevada expressão de laminina e fibronectina em diversas regiões, principalmente em locais onde são observados uma migração neuronal, estando estas moléculas envolvidas com a migração de células neuronais e com o crescimento axonal (Pires-Neto, 1999; Novak e Kaye, 2000). Entretanto, a expressão destas moléculas diminui ao final do desenvolvimento, sendo observadas na vida adulta, em condições fisiológicas, apenas ao redor dos vasos e na interface do tecido nervoso com a pia-máter (Venstrom e Reichardt, 1991).

O colágeno tipo IV também pode ser observado durante o desenvolvimento do sistema nervoso, em regiões da crista neural, medula espinhal, lâmina basal dos nervos periférico,

junção neuromuscular e interior do encéfalo. Entretanto, durante a vida adulta, apenas pequenas quantidades desta molécula podem ser detectadas no parênquima cerebral, particularmente na membrana basal dos vasos (Rutka *et al*, 1988).

Além das glicoproteínas citadas acima, as quais foram alvos do nosso estudo, outras moléculas de ECM também podem ser detectadas no SNC, sendo as proteoglicanas, a tenascina e a trombospondina os principais constituintes desta matriz (Aquino *et al*, 1984; Novak e Kaye, 2000).

Apesar da expressão de algumas moléculas de ECM, inclusive de fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, diminuir ao longo do desenvolvimento, e durante a vida adulta encontrarem-se restritas a algumas regiões do SNC, vem sendo demonstrado que a expressão destas moléculas no SNC é modulada após diferentes tipos de lesão (revisado por Stichel & Müller, 1998). Por exemplo, há um aumento de laminina e colágeno tipo IV após lesão de medula espinhal, sendo este aumento observado na região da lesão e em regiões do parênquima, próximas ao local aonde a lesão foi induzida (Tuszynski *et al.*, 2002).

As principais células descritas na produção de ECM após lesão do SNC são os astrócitos (Smith *et al.*, 1986; McKeon *et al.*, 1991; Canning *et al.*, 1996; Fitch & Silver, 1997; Powel *et al.*, 1997; Davies & Silver, 1998; Filder *et al.*, 1999), os macrófagos (Davies *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2002), uma população de células progenitoras oligodendrogliais (Fawcett & Asher, 1999; Filder *et al.*, 1999; Asher *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002), e as células de Schwann, as quais são capazes de migrar do SNP para o local da lesão (Tuszynski *et al.*, 2002).

Considerando-se a relevância dos elementos de ECM na fisiologia do SNC e considerando-se a importância deste sistema para a manutenção da homeostasia, poderíamos imaginar que alterações na expressão destas moléculas, associadas a diferentes patologias, gerasse um estímulo haptotático, e como consequência, um afluxo de leucócitos para o local.

1.5. Objetivos

Estudos anteriores vêm demonstrando que a infecção pelo *T. cruzi* cursa com diversas alterações no sistema imune e em órgãos-alvo como o coração e o sistema nervoso.

Dentre as modificações observadas, podemos citar as alterações dos elementos de ECM, as quais vêm sendo correlacionadas com distúrbios de migração linfocitária, e com a gênese da miocardiopatia.

Conforme mencionado, o SNC também é afetado durante o curso da Doença de Chagas, sendo observado um infiltrado inflamatório em regiões de parênquima, além de um aumento na expressão de proteínas de ECM tais como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV. Entretanto, não há estudos evidenciando quais tipos celulares poderiam estar envolvidos na síntese de ECM nesta condição patológica, e nem como um aumento destas moléculas poderia interferir com as interações entre células do sistema imune e células de tecido nervoso, particularmente células neuronais.

Considerando-se a importância dos elementos de ECM, tal abordagem poderia ser relevante para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação de linfócitos T com células neuronais na infecção pelo *T. cruzi*, tendo em vista que este tipo celular é raramente parasitado, e que mecanismos de autoimunidade vêm sendo implicados na gênese das lesões neuronais observadas durante a infecção pelo

parasita. Uma das maneiras de se abordar esta questão é a realização de experimentos em condições desfavoráveis à existência de interações TCR/MHC, de modo a melhor identificarmos aquelas interações mediadas por ECM. Neste contexto inserimos o nosso trabalho. Assim, utilizando um modelo *in vitro*, procuramos analisar as seguintes questões:

- Como a infecção pelo *T. cruzi* poderia interferir na expressão de elementos de ECM por células neuronais oriundas do SNC?
- Como tal infecção poderia interferir na interação entre linfócitos e células neuronais, e qual seria o envolvimento de ligantes e receptores de ECM nesta interação?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Camundongos isogênicos BALB/c machos, com idade entre 6 e 8 semanas foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz. É importante ressaltar que, todos os procedimentos envolvendo animais, foram realizados de acordo com as normas estabelecidas e aprovadas no protocolo P0 145-02 pelo comitê de ética em experimentação animal desta Instituição. Em cada tipo de experimento, foram incluídos pelo menos 5 animais de cada grupo (não-infectados e infectados pelo *T. cruzi*).

2.2. Cultivos de células neuronais

2.2.1. Cultura da linhagem N2a

O clone N2a foi estabelecido a partir de um neuroblastoma espontâneo em camundongo albino, originado a partir de células da medula espinhal (Klebe e Ruddle, 1969). Em nosso laboratório, esta linhagem celular foi cultivada em atmosfera com 5% de CO₂ a 37° C, e mantida em meio completo (RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal 10%, 10mM de HEPES, 100.000 UI/L de penicilina, 2mM de L-glutamina, e 1% de piruvato de sódio), obtidos junto à Gibco/BRL (Gaithersburg, EUA).

A manutenção das culturas foi realizada através de sucessivas passagens: ao atingirem estado de semi-confluência, as células N2a foram submetidas à digestão enzimática à temperatura ambiente durante cinco minutos, com solução de tripsina 0,25% e EDTA 0,02%, preparada em salina livre de cálcio e magnésio (ph 7,2). Em seguida, as células foram lavadas por centrifugação (1200 rpm por 5 minutos à 24°C) em meio suplementado com 10% de soro bovino fetal. Após serem lavadas, as células viáveis foram contadas em

câmara de Neubauer (utilizando-se o método de exclusão pelo azul de trypan,) e plaqueadas em frascos de 25 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a uma concentração de 2,5 x 10⁵ células/ml.

2.2.2. Cultura primária de neurônios

As culturas primárias de neurônios foram obtidas de acordo com o método descrito por Gomes e colaboradores (1996), sendo gentilmente cedidas pelo Laboratório de Morfogênese Celular, Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro. De acordo com este protocolo, camundongos suíços de 15 dias fetais foram decaptados, os cérebros foram removidos em condições estéreis e transferidos para uma solução tampão de salina-fosfato (8% NaCl; 5,36% Na₂HPO₄; 0,4% KH₂PO₄ e 0,9% KCl e glicose 0,6%). As meninges foram então delicadamente removidas, e os hemisférios cerebrais dissecados, possibilitando a obtenção dos córtex cerebrais dos camundongos. Uma vez removidos, os córtex cerebrais foram cortados em pequenos fragmentos, os quais foram transferidos para um tubo de 15 ml (Nunc) contendo meio de cultura DMEM F-12 (Gibco, Gaithersburg, USA). As células foram mecanicamente dissociadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e centrifugadas a 3000g durante 4 min. à temperatura ambiente. O precipitado celular obtido foi ressuspensão em meio Neurobasal-A suplementado com B-27 (Gibco, Gaithersburg, USA), e após contagem em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas e mantidas em cultura em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi trocado de 3 em 3 dias.

2.3. Protocolos de infecção

2.3.1. Infecção dos animais

A infecção dos camundongos BALB/c utilizados nos diferentes protocolos experimentais foi realizada através de inoculação via intraperitoneal de 10^5 parasitas diluídos em PBS 0,15mM, pH 7,2. Os parasitas utilizados na infecção *in vivo* foram isolados a partir do sangue de camundongos BALB/c, infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, e sacrificados no pico de parasitemia (21 dias após a infecção).

2.3.2. Infecção *in vitro*

Para a manutenção do *T. cruzi in vitro*, estabelecemos cultivo de células Vero, plaqueadas em frascos de 25cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) à concentração de 2×10^4 células/mL. Após 24 horas, as culturas foram infectadas com formas tripomastigotas da cepa “Colombiana” do *T. cruzi* (Federici et al, 1964), isoladas do sangue periférico de camundongos BALB/c machos, de 7-8 semanas de idade. A infecção de células Vero foi realizada numa relação de 20 parasitas/célula inicialmente plaqueada. Decorridas 6 horas de infecção, os parasitas livres foram retirados do sobrenadante por repetidas lavagens em PBS. Após cinco dias de infecção, os parasitas liberados foram recolhidos, lavados por centrifugação (3000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente) e contados em câmara de Neubauer.

A infecção de células N2a foi realizada utilizando-se formas tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* mantidas em até cinco passagens sucessivas de cultivo de células Vero, conforme explicado acima. Decorridas 24 horas após o plaqueamento das células,

as culturas de N2a foram submetidas à infecção pelo *T. cruzi* à razão de 20 parasitas por N2a inicialmente plaqueada, sendo os parasitas mantidos durante 6 horas. Após este período, as culturas foram exaustivamente lavadas, possibilitando a remoção de formas tripomastigotas de parasitas ainda presentes no sobrenadante.

A infecção das culturas primárias de neurônios foi feita após 4-5 dias do plaqueamento dos neurônios, utilizando-se formas tripomastigotas à razão de 5 parasitas por neurônio inicialmente plaqueado. Seis horas após, as culturas foram lavadas possibilitando a remoção de formas tripomastigotas ainda presentes no sobrenadante.

2.4. Anticorpos e sistemas de revelação

Os ensaios de imunoperoxidase foram realizados utilizando-se anticorpos produzidos em coelho específicos para laminina, fibronectina ou colágeno tipo IV, obtidos junto à Novotec (St. Martin-la-Garenne, França). Estes reagentes são capazes de reconhecer de forma específica as proteínas de ECM correspondentes, tanto em tecidos provenientes de camundongos normais como de animais infectados pelo *T. cruzi*, conforme previamente estabelecido (Savino et al, 1989). Como sistema de revelação foi utilizado soro de ovelha conjugado à biotina capaz de reconhecer especificamente imunoglobulina de coelho, o complexo estreptavidina-peroxidase (ambos obtidos junto à Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), o substrato enzimático 3-amino-etilcarbazol (Sigma, St. Louis, EUA) e H₂O₂ (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

Nos ensaios de imunofluorescência indireta para a detecção de elementos de ECM, foram utilizados os mesmos imunossoros descritos acima. Como sistemas de revelação foram utilizados soros de cabra anti-Ig de coelho, conjugados ao isotiocianato de fluoresceína

(GAR/FITC) ou ao “cychrome” (GAR/Cy3), obtidos junto à Biosys (Compiègne, França) e à Sigma (St. Louis, EUA), respectivamente. Conforme será abordado posteriormente, os mesmos anticorpos específicos para os elementos de matriz extracelular utilizados nos ensaios de imunocitoquímica, foram empregados nos ensaios de adesão.

Para a avaliação do percentual de infecção foi utilizado soro de coelho infectado pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, em fase aguda da infecção, preparado em nosso Laboratório. Antes da sua utilização, o soro policlonal anti- *T. cruzi* foi adsorvido em células N2a ou em neurônios provenientes da cultura primária.

A adsorção foi realizada adicionando o soro policlonal anti-*T. cruzi* à uma suspensão de células N2a (com 48 h de cultura) ou de neurônios provenientes da cultura primária (5-7 dias) em relação volume-volume, submetido à agitação durante 40 minutos, e centrifugados a 12000 rpm por 1 min à temperatura ambiente. O sobrenadante assim obtido foi utilizado para análise do percentual de células infectadas. Este procedimento nos permitiu garantir que o soro utilizado para a detecção do parasita não estaria reconhecendo de forma cruzada o *T. cruzi* (ou antígenos deste) e estruturas das células N2a ou dos neurônios. A presença de *T. cruzi* foi revelada com GAR/FITC ou GAR/Cy3. As análises citofluorométricas foram realizadas utilizando-se os seguintes anticorpos monoclonais em diluições adequadas e previamente estabelecidas: anti-TCR $\alpha\beta$ /FITC, anti-CD8 α /Cy-chrome, anti-CD49d/FITC, anti-CD49e/PE (Pharmlingen/Becton-Dickinson, San Diego, USA); anti-CD49f/FITC (Immunotech, Marseille, France); anti-CD4/PE ou anti-CD4/FITC (Caltag, San Diego, USA). Anticorpos não-relacionados, mas de mesmo isotipo e acoplados aos mesmos fluorocromos listados acima, foram utilizados como controles negativos, sendo obtidos junto à Pharmlingen. As características gerais

dos anticorpos primários descritos acima encontram-se resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos primários para detecção de ligantes e receptores de matriz extracelular e proteínas de superfície de linfócitos T

Anticorpo	Clone	Especificidade Molecular
anti-fibronectina	Imunossoro	Fibronectina (sem discriminar isoformas)
anti-laminina	Imunossoro	Laminina (sem discriminar isoformas)
anti-colágeno IV	Imunossoro	Colágeno tipo IV
anti-VLA-4	clone R1-2	CD49d (cadeia α -4 do receptor de fibronectina)
anti-VLA-5	clone MFR5 - 5H10	CD49e (cadeia α -5 do receptor de fibronectina)
anti-VLA-6	clone GoH3	CD49f (cadeia α -6 do receptor de laminina)
anti-TCR $\alpha\beta$	clone WT 31	Cadeia β do receptor de células T
anti-CD4	clone YTS 191.1	CD4
anti-CD8	clone 53-6.7	CD8 α

2.5. Imunocitoquímica

Para a realização dos ensaios de imunofluorescência indireta, as células em cultura foram fixadas em paraformaldeído 4%, por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo em seguida exaustivamente lavadas em PBS. Posteriormente, o material foi incubado com anticorpo primário por 1 h, lavado por 3 vezes consecutivas com PBS, e incubado por 40 min com GAR/FITC ou GAR/Cy3, conforme descrito anteriormente. Após 3 lavagens

sucessivas em PBS, as culturas foram observadas em microscópio de fluorescência (Hund Wetzlar, Alemanha).

Nos ensaios de imunoperoxidase, foi utilizado anticorpo secundário conjugado à biotina, seguido de estreptavidina-peroxidase. Após sucessivas lavagens em PBS, a atividade enzimática foi revelada com aminoetilcarbazol em presença de H₂O₂ 0,03%.

2.6. Avaliação dos percentuais de infecção

A fim de estabelecermos o percentual de células infectadas em cultivos neuronais, as células N2a foram inicialmente plaqueadas a uma concentração de 4×10^3 células por poço (Lab-Tek de 4 câmaras; Nunc, Roskilde, Dinamarca), sendo posteriormente submetidas à infecção de acordo com o protocolo abordado no item anterior. Seis horas após, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 10 minutos à temperatura ambiente. As formas amastigotas do *T. cruzi* foram detectadas por técnica de imunofluorescência indireta, e o percentual de células infectadas (em um total de 300 células) foi avaliado por contagem direta ao microscópio de fluorescência.

Os neurônios derivados de culturas primárias foram inicialmente plaqueados à concentração de 10^5 células/poço em lamínulas de vidro em placa de 24 poços com 16mm^2 (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Decorridos 4-5 dias, as culturas foram submetidas à infecção, e após 6 horas foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente submetidas à imunofluorescência indireta e o percentual de células infectadas determinado.

2.7. Detecção de componentes da matriz extracelular

Com a finalidade de detectarmos a presença de elementos de matriz extracelular (fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV), as células N2a foram plaqueadas à concentração de 2×10^3 células/poço (Lab-Tek de 8 câmaras), sendo fixadas 48 horas após com paraformaldeído 4% por 10 minutos à temperatura ambiente, e submetidas a ensaios de imunoperoxidase.

Com o objetivo de avaliarmos a cinética de expressão de ECM, as culturas foram plaqueadas à concentração de 2×10^3 células/poço (Lab-Tek de 8 câmaras), infectadas ou não pelo *T. cruzi*, fixadas 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção, e posteriormente, submetidas à imunofluorescência indireta.

Numa série de outros ensaios, células N2a foram plaqueadas à concentração de 2×10^3 células por poço (Lab-Tek de 8 câmaras) e após 24 horas submetidas ao tratamento com sobrenadante de cultura de células N2a infectada, sobrenadante de cultura de células N2a normal, meio axênico ou infecção pelo *T. cruzi* conforme o protocolo mencionado. Decorridas 48 horas do tratamento ou infecção, as culturas foram fixadas em paraformaldeído 4%, por 10 minutos à temperatura ambiente, e a detecção de proteínas de ECM definida por imunofluorescência indireta.

O protocolo utilizado para a obtenção dos sobrenadantes será descrito posteriormente.

No que diz respeito às culturas primárias de neurônios, as células foram inicialmente plaqueadas à concentração de 10^5 células/poço (placa de 24 poços de 16 mm^2), e submetidas ou não à infecção pelo *T. cruzi*. Vinte e quatro horas após, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, sendo as proteínas de ECM detectadas por imunofluorescência indireta.

2.8. Obtenção de sobrenadantes de culturas infectadas e de meio axênico de cultivo de *Trypanosoma cruzi*

A fim de obtermos os sobrenadantes para posterior utilização em nossos experimentos, células N2a foram plaqueadas à concentração de 4×10^4 células/ml em placas de Petri de $35 \times 10 \text{ mm}^2$ (Nunc) sendo posteriormente submetidas ou não à infecção pelo *T. cruzi*. Decorridas 48 horas, os sobrenadantes das culturas controles, assim como das culturas infectadas, foram recolhidos para posterior utilização.

Para a obtenção do meio axênico, formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram cultivadas em meio completo à concentração de $1,6 \times 10^6$ parasitas/ml em placas de Petri de $35 \times 10 \text{ mm}^2$, sendo o sobrenadante recolhido após 48 horas de cultivo.

Os sobrenadantes obtidos das culturas infectadas ou não, assim como o meio axênico, foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente, o que possibilitou a precipitação de formas tripomastigotas do parasita que porventura pudessem estar presentes nos sobrenadantes. Este procedimento nos permitiu garantir que os sobrenadantes utilizados nos tratamentos realmente não continham o parasita. Após a centrifugação, ainda nos certificamos da ausência deste nos sobrenadantes adquiridos, através da observação dos sobrenadantes em microscópio ótico.

2.9. Análise do ciclo celular em cultivos de células N2a

As células N2a foram inicialmente plaqueadas à concentração de 10^5 células/mL em frasco de 25 cm^2 , e submetidas ou não à infecção pelo *T. cruzi* conforme protocolo mencionado. Decorridas 48h após a infecção, foi realizada a análise do ciclo celular por

iodeto de propídeo de acordo com a técnica descrita por Vindelov (1977). As células foram obtidas por tripsinização, e incubadas por vinte minutos a 4°C, com 1mL da solução de Vindelov (Tris-HCl 3.4mM, pH=7.6, iodeto de propídeo 0.075 mM; NP-40 (v/v); ribonuclease de pâncreas bovino 700 UL e NaCl 10mM). Todos esses reagentes foram obtidos junto à Sigma Co. As células foram então analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson, San Diego, USA) utilizando-se o “*software*” Cell Quest, e determinação inicial de parâmetros de tamanho e granulosidade.

2.10. Detecção de apoptose em células neuronais

As células N2a foram inicialmente plaqueadas a uma concentração de 10^5 células/mL e submetidas ou não à infecção pelo *T. cruzi* conforme protocolo mencionado. Quarenta e oito horas após, as células foram tripsinizadas e incubadas com 150 µl de 7AAD (Sigma Co.) à concentração de 20 µg/ml para cada 5×10^5 células. A incubação foi procedida protegida da luz, a 4°C durante 20 min, e as células foram posteriormente analisadas em citômetro de fluxo utilizando-se o *software* Cell Quest.

2.11. Preparação de esplenócitos enriquecidos em células T

Visando a um enriquecimento *in vitro* de células T, os esplenócitos foram obtidos de camundongos normais ou no pico de parasitemia da fase aguda da infecção, isto é, 21 dias. Para tal, o baço foi removido, macerado em presença de meio completo, e as células obtidas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuspenso e incubado durante 10 min com solução hemolisante de NH₄Cl 0,85%. Após este período a atividade da solução hemolisante foi bloqueada com

15 ml de meio completo. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1500 rpm por 10 min à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi recolhido e descartado, sendo a viabilidade das células avaliada com azul de trypan.

A amostra celular depletada de hemácias foi enriquecida em células T através de passagem em coluna de lã de nylon (Polysciences, Inc., Warrington, USA), conforme descrito por Julius e colaboradores (1973). Para tal, as colunas foram inicialmente lavadas com 40 ml de meio completo, sendo então acrescentada suspensão 2×10^8 células em 2 ml, e incubação à temperatura ambiente durante 1h. As células foram eluídas da colunas através de sucessivas lavagens com 40 ml de meio RPMI 1640.

A eficácia desta metodologia foi avaliada por citofluorimetria utilizando-se anticorpos monoclonais anti-TCR/FITC, anti-CD4/PE e anti-CD8/Cy: obtivemos um percentual de aproximadamente 85% de células T no grupo controle e de 90% no grupo infectado.

2.12. Adesão de linfócitos à linhagem N2a

Células N2a foram inicialmente plaqueadas a uma concentração de 5×10^4 células/mL, e submetidas ou não à infecção pelo *T. cruzi* conforme protocolo previamente mencionado. Decorridas 48 horas após, as culturas controles assim como as infectadas foram co-cultivadas com esplenócitos enriquecidos em células T (50 esplenócitos por N2a) derivadas de animais infectados ou não (conforme mencionado acima), durante 1 hora a 37°C e em atmosfera de CO₂, sendo os primeiros 30 minutos em repouso, e os demais em agitação a 60 rpm. As células não-aderentes foram delicadamente aspiradas, até que permanecessem apenas os esplenócitos aderidos às células N2a.

Após o ensaio de adesão, as co-culturas de células N2a e esplenócitos foram fixadas em metanol, coradas com Giemsa (Merck, Rio de Janeiro) durante 20 minutos à temperatura ambiente, e o número de esplenócitos aderidos por célula N2a, assim como o número de células N2a que apresentavam esplenócitos aderidos foi contado considerando-se um total de 300 células N2a. Os resultados foram expressos como um índice de adesão (IA), conforme previamente estabelecido em nosso laboratório visando avaliar a adesão de timócitos a células epiteliais tímicas (Lannes-Vieira et al, 1993; Lagrota -Cândido et al, 1996; Mello-Coelho et al, 1997). Utilizamos a seguinte fórmula:

$$IA = \frac{\text{N2a com esplenócitos aderidos}}{\text{N2a total}} \times \frac{\text{esplenócitos aderidos às N2a}}{\text{N2a total}} \times 100$$

Alternativamente, medimos a frequência de esplenócitos aderidos, definida como a razão de células aderidas sobre o total de esplenócitos colocados para aderir.

2.13. Avaliação citofluorimétrica do fenótipo dos esplenócitos aderidos.

A avaliação fenotípica de sub-populações de linfócitos T foi realizada por citofluorimetria utilizando-se tripla coloração conforme descrito (Dalmau et al, 1999). Os esplenócitos aderidos sobre as células N2a foram obtidos através de agitação das culturas e sucessivas lavagens, plaqueados em microplacas de fundo em “V” à concentração de 10^6 células/poço e incubados durante 30 minutos a 4° C com anticorpos monoclonais anti-TCR $\alpha\beta$ /FITC, anti-CD4/PE e anti-CD8/Cy, ou anti-CD4/PE, anti-CD8/Cy, ou anti-CD4/PE, anti-CD8/Cy e anti-VLA-4/FITC, ou anti-CD4/FITC, anti-CD8/Cy e anti-VLA-

5/PE, ou anti-CD4/PE, anti-CD8/Cy e anti-VLA-6/FITC diluídos adequadamente em PBS/2% de soro bovino fetal. Após lavagem, as células foram recolhidas e fixadas em solução de PBS/azida sódica 0,05% contendo 1% de formaldeído, em volume final de 200 µl por amostra, sendo analisadas por citometria de fluxo, utilizando o programa CellQuest. Para a obtenção da população celular a ser estudada, realizamos uma janela (“gate”) celular utilizando parâmetros de tamanho *versus* granularidade o que nos possibilitou a exclusão de debris ou células mortas. Nossas análises foram realizadas após obtenção de 10.000 a 40.000 células por amostra. Em alguns experimentos, também avaliamos a frequência de adesão de linfócitos T de fenótipo CD4⁺ ou CD8⁺.

2.14. Participação da matriz extracelular na adesão de linfócitos T as células N2a

Objetivando avaliar o papel dos elementos de ECM, fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, na adesão de esplenócitos à cultura de células N2a, realizamos experimentos nos quais as culturas foram inicialmente plaqueadas à concentração de 5×10^4 células/mL em frascos de 25 cm². Após 72 horas, as culturas foram tratadas durante 30 minutos com anticorpos específicos para laminina, fibronectina ou colágeno tipo IV, ou ainda com um anticorpo irrelevante, obtidos conforme já mencionado, utilizados à concentração de 10 µg/ml conforme previamente descrito por nosso Laboratório (Villa-Verde et al, 1994).

Após o tratamento, foi realizado o ensaio de adesão, seguido por fixação das culturas, coloração por Giemsa e determinação do índice de adesão. Cabe ressaltar que nestes experimentos as co-culturas foram realizadas entre os esplenócitos provenientes de camundongos infectados e as culturas de células N2a não-infectadas.

2.15. Avaliação estatística

Para compararmos os índices de adesão entre as co-culturas tratadas com anticorpo anti-ECM e a co-cultura controle, utilizamos o teste Tukey, que permite comparação estatística entre valores de índice. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Infecção *in vitro* de células do sistema nervoso central pelo *Trypanosoma cruzi*

Considerando-se que durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* observa-se *in vivo* um intenso parasitismo em diversos tecidos, inclusive em células do sistema nervoso central, investigamos se células neuronais, oriundas da linhagem celular de neuroblastoma N2a, assim como cultivos primários de neurônios poderiam ser infectadas *in vitro* pelo *T. cruzi*. Observamos que, após seis horas de infecção, 30-40% das células N2a apresentavam-se infectadas pelo *T. cruzi*, enquanto que nas culturas primárias este percentual variou entre 20-25% (Fig. 1). No entanto, se levarmos em consideração que a relação n° de parasitas/n° de células neuronais foi de 20/1 para as células N2a e de 5/1 para os neurônios de cultivos primários, é possível que a sensibilidade à infecção pelo *T. cruzi* dos neurônios de cultivos primários seja maior que à das células de neuroblastoma.

3.2. Características gerais das células neuronais após infecção *in vitro* pelo *Trypanosoma cruzi*

Observamos que a infecção pelo *T. cruzi* resultou em alteração no aspecto microscópico das células N2a, as quais apresentavam-se com um maior tamanho e com um aspecto vacuolizado quando comparadas às células das culturas não infectadas (Fig. 2 a-b). Alterações morfológicas semelhantes foram observadas nas culturas primárias de neurônios infectadas pelo parasita (dados não mostrados).

Ao analisarmos parâmetros de tamanho e granulosidade por citometria de fluxo, vimos que as culturas de neuroblastoma infectadas apresentaram perfil de tamanho e granulosidade maior que culturas normais (Fig. 2 c-d). De fato, cerca de 60% das células oriundas de cultivos de 48 horas de infecção apresentavam-se maiores e mais granulosas

que os cultivos controles. Tal diferença correspondeu ao percentual de células infectadas, após 48 horas de cultura.

Além disso, observamos diminuição de cerca de três vezes, no número de células N2a nas culturas infectadas quando comparadas com às culturas controles.

Procuramos então verificar se este fenômeno seria acarretado por um aumento da morte celular e/ou por uma alteração no ciclo celular das culturas infectadas. Até o momento, realizamos um experimento, onde a infecção não acarretou aumento de morte celular, mas sim alteração do ciclo celular, com maior percentual de células na fase de síntese nas culturas infectadas quando comparadas às culturas controles (Fig. 3).

3.3. A infecção *in vitro* pelo *Trypanosoma cruzi* modula a expressão de ligantes de matriz extracelular

Sabendo-se que a infecção *in vivo* pelo *T. cruzi* é capaz de modular a expressão de elementos de ECM em sítios diversos, incluindo sistema nervoso central (Silva et al., 1999b), coração (Andrade et al., 1989) e órgãos linfóides (Lima-Quaresma, 1999), e ainda tendo em vista que a infecção *in vitro* de diferentes tipos celulares induz efeito similar (Farias-de-Oliveira, 2001; Corrêa-de-Santana, 1999), procuramos investigar se tal efeito também poderia ocorrer na infecção neuronal *in vitro*.

Observamos inicialmente que tanto a linhagem de neuroblastoma como os neurônios oriundos de cultivo primário expressam constitutivamente fibronectina, laminina e colágeno tipo IV (Figs. 4-5). Por outro lado, a infecção pelo *T. cruzi* resultou em aumento da expressão de fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, tanto nas células N2a quanto

nas culturas primárias de neurônios, sendo esta modulação evidenciada através de análises por imunofluorescência indireta (Fig. 6 a-d).

Uma análise cinética mostrou que tal efeito poderia ser detectado 12 horas após a infecção, enquanto que no tempo mais precoce, 6 horas pós-infecção, não vimos diferença no padrão de ECM entre as culturas infectadas e não-infectadas (dados não mostrados).

Cabe ressaltar, que a modulação dos ligantes de ECM não se apresentou restrita às células parasitadas da cultura infectada (dados não mostrados).

Tais achados nos levaram a pensar que o parasita poderia estar modulando de forma indireta a expressão de ECM. Realizamos então experimentos nos quais as culturas não infectadas foram submetidas ao tratamento com sobrenadante oriundo de uma cultura infectada, ou alternativamente, com meio axênico de cultivo de *T. cruzi*. Observamos que o sobrenadante obtido a partir da cultura infectada foi capaz de acarretar um aumento de expressão de fibronectina, laminina e colágeno tipo IV; o mesmo não sendo observado em relação ao meio axênico de *T. cruzi* (Fig. 6 e-f).

3.4. A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* aumenta a adesão de linfócitos T sobre células neuronais

Considerando-se o aumento da expressão de ligantes de ECM por células N2a mediante a infecção pelo *T. cruzi*, e ainda, a importância destas moléculas no processo de adesão e migração linfocitária, procuramos avaliar se a infecção poderia interferir no processo de adesão entre células do sistema imune, representadas por linfócitos T obtidos de camundongos infectados ou não, e células do sistema nervoso, representadas pela

linhagem de neuroblastoma N2a. Vimos que a infecção, de um dos sistemas ou de ambos, resultou em aumento na adesão de células T às células N2a, quando comparada à adesão de células T provenientes de camundongos não-infectados sobre culturas de N2a não-infectadas.

O aspecto geral das culturas, assim como a quantificação da adesão (conforme descrito no ítem Materiais e Métodos), podem ser observados na Figura 7.

Nosso próximo passo foi determinar o fenótipo dos linfócitos T aderidos sobre células N2a, na presença ou ausência de infecção (*in vivo* ou *in vitro*). Através de análises citofluorimétricas, vimos que na ausência total de infecção ocorre um predomínio na adesão de células T CD4⁺. A adesão preferencial desta subpopulação celular também foi observada quando apenas a cultura de células N2a foi infectada, apesar de a proporção CD4/CD8 variar, já que nesta condição experimental, o aumento de adesão ocorreu devido à maior interação de células T CD8, enquanto que a adesão de T CD4 a células N2a permaneceu praticamente inalterada quando comparada ao grupo controle, ou seja, a co-cultura de N2a não-infectada e células T de animais não-infectados.

Por outro lado, o aumento do índice de adesão observado quando esplenócitos derivados de animais infectados foram co-cultivados com N2a infectadas ou não, foi decorrente de um aumento na adesão tanto de células T CD4⁺ como de células T CD8⁺ (Fig. 8).

3.5. A adesão de linfócitos T sobre células neuronais é mediada por interações envolvendo matriz extracelular

Considerando haver um aumento dos ligantes e receptores de ECM mediante a infecção, respectivamente, na linhagem de neuroblastoma e nos esplenócitos (Lima-Quaresma,

1999), e ainda, um aumento na adesão de células T sobre células N2a na vigência de infecção pelo *T. cruzi*, decidimos avaliar se o aumento de ECM poderia estar favorecendo o evento de adesão, uma vez que estes elementos encontram-se intimamente envolvidos com os fenômenos de migração e adesão celulares. De fato, observamos que o tratamento prévio das culturas de N2a com anticorpos anti-fibronectina, anti-laminina ou anti-colágeno tipo IV, acarretou diminuição de adesão quando comparado aos valores obtidos após tratamento com anticorpo irrelevante. Por outro lado, não ocorreu uma diferença significativa ao compararmos os tratamentos entre si (Fig. 9).

3.6. Modulação de receptores de matriz extracelular em esplenócitos, após adesão a células N2a

A fim de melhor compreendermos os mecanismos moleculares envolvidos no fenômeno de adesão entre as células neuronais e células do sistema imune, optamos por analisar a expressão dos receptores de fibronectina e laminina (respectivamente, VLA-4, VLA-5 e VLA-6) na população de esplenócitos aderidos às células N2a após as diferentes condições de co-cultura. Para tal, determinamos os percentuais de células expressando alta densidade de cada receptor analisado (células VLA^{high}). Observamos haver um predomínio de esplenócitos VLA-4^{high} e VLA-5^{high} quando esplenócitos de animais normais foram co-cultivados com células N2a controle ou infectada pelo *T. cruzi*.

Resultado semelhante foi observado ao analisarmos a população de esplenócitos oriundos de animais infectados aderida à cultura de N2a infectada.

Por outro lado, a análise dos esplenócitos de animais infectados após co-cultivo com células N2a controles, nos permitiu evidenciar um predomínio de esplenócitos VLA-6

positivos dentre a população de células aderentes. Também observamos aumento na densidade de VLA-6 ao compararmos a expressão desta molécula em esplenócitos infectados antes e após a co-cultura com N2a controle.

O percentual de esplenócitos positivos para VLA-4, VLA-5 e VLA-6 antes, e após as diferentes condições de adesão pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Expressão de receptores de fibronectina e de laminina em esplenócitos enriquecidos em células T, após adesão *in vitro* a células N2a, na ausência ou vigência de infecção pelo *Trypanosoma cruzi**

	VLA-4	VLA-5	VLA-6
SP N**	1,84	6,16	6,31
N2a N x SP N	10,81	18,28	6,62
N2a I x SP N	9,53	17,98	6,37
SP I	18,39	8,51	17,26
N2a I x SP I	21,98	27,23	6,35
N2a N x SP I	18,81	13,75	31,83

*Os valores mostrados correspondem aos percentuais de células expressando alta densidade de cada receptor. Tais valores são representativos de 3 experimentos independentes. **N2a N e N2a I referem-se as culturas não-infectadas e infectadas, respectivamente; SP N e SP I referem-se aos esplenócitos obtidos de animais não-infectados e infectados, respectivamente

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, desenvolvemos estudo *in vitro* sobre interações celulares entre neurônios e linfócitos T, em um contexto de infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, procurando avaliar a participação de componentes da matriz extracelular.

Um dos aspectos que abordamos inicialmente foi a possibilidade de infectarmos neurônios *in vitro*, fossem essas células derivadas de um neuroblastoma ou de cultivos primários. Em ambos os casos houve infecção, corroborando a noção de que, apesar de raros, os neurônios podem ser infectados *in vivo* (Tanowitz, 1982). Nos modelos aqui avaliados, a infecção é patente e a presença de células infectadas (muito maior do que o observado *in vivo*) se deve parcialmente à exposição direta dos neurônios ao parasita, eliminando entre outras, a barreira hemato-encefálica.

Por outro lado, em experimentos realizados mais recentemente, vimos que astrócitos também podem ser infectados *in vitro* (Fig. 10), e que a permissividade à infecção é 3-4 vezes maior que aquela observada em neurônios, corroborando a maior infectividade observada *in vivo* (Da Mata, 2000 apud Vilela & Vilela, 1932). Assim, é possível que características diferenciais específicas a cada tipo celular, também contribuam para tal diferença de permissividade à infecção pelo *T. cruzi*.

Já é bem estabelecido na literatura que a infecção de fibroblastos e células epiteliais pelo *T. cruzi* resulta na morte das células parasitadas (Brener, 1973; Ming *et al.*, 1995). Entretanto, nossos ensaios avaliando a apoptose de células neuronais evidenciaram que a infecção da cultura de neuroblastoma não acarretou em um aumento da morte celular quando comparado à cultura controle.

Estes resultados corroboram com estudos recentes que propõe um papel protetor do *T. cruzi*, especificamente da trans-sialidase, após a infecção de células nervosas (Chuenkova et al., 2000; 2001).

Por outro lado, apesar do aparente papel protetor da trans-sialidase sob células neuronais durante a infecção pelo *T. cruzi*, foi demonstrado que esta é capaz de induzir apoptose intratímica no complexo de células *nurse* (Mucci et al., 2002).

Acredita-se que a sobrevivência de células neuronais induzida pelo próprio parasita (em contraste com a morte de outros tipos celulares que também são parasitados) possa minimizar as lesões neuronais observadas durante a infecção, o que conseqüentemente interfere com a relação parasita/hospedeiro, uma vez que o sistema nervoso é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia (Chuenkova et al., 2001).

Em um experimento realizado, evidenciamos aumento no percentual de células em síntese nas culturas de N2a infectadas quando comparado as culturas controles. Por outro lado, não foi observado um aumento proporcional no percentual de células em fase de G2/M nas culturas infectadas. Esses dados, apesar de necessitarem de confirmação, nos permitem especular que a infecção poderia estar interrompendo o ciclo celular durante a fase de síntese.

Por outro lado, será também necessário identificar, de forma precisa, se estas alterações são restritas às células parasitadas, ou se também poderiam ser observadas nas células não-parasitadas da cultura infectada. Nesse sentido, um aumento de fase S, poderia decorrer da síntese de DNA do parasita, e não da célula-hospedeira. Tal hipótese é sustentada pelos dados de citometria de fluxo de tamanho “*versus*” granulosidade, que nos permitiram evidenciar que o aumento de tamanho observado na cultura infectada foi

propiciado pela população de maior granulosidade, a qual se deve muito provavelmente à presença de formas amastigotas do parasita no interior das células. Assim, teremos que efetuar experimentos envolvendo bromodeoxiuridina e posterior análise das culturas ao microscópio óptico, o que nos permitirá contar, de forma diferencial, apenas os núcleos em fase S das células neuronais.

Nossos estudos envolvendo detecção de ECM demonstraram que a infecção pelo *T. cruzi* acarretou aumento de fibronectina, laminina e colágeno tipo IV na linhagem de neuroblastoma e nos neurônios oriundos de cultivo primário.

Tendo em vista as semelhanças de comportamento observadas entre as culturas de N2a e as culturas primárias, usamos células N2a para a realização dos experimentos subseqüentes.

Também notamos que a modulação de ECM nas culturas de neuroblastoma infectadas mostrou-se tempo-dependente, não ocorrendo nas primeiras horas após a infecção. Isto poderia sugerir que o aumento de ECM necessite de síntese “*de novo*” das diferentes moléculas, e não signifique apenas um aumento na secreção. Experimentos utilizando técnicas de “*immunoblotting*” e “*northenblotting*” serão necessárias para demonstrar respectivamente uma possível modulação dessas proteínas e dos RNA mensageiros correspondentes.

Os mecanismos envolvidos na modulação de ECM pela infecção ainda não se encontram esclarecidos. Entretanto, nossos resultados evidenciando aumento na deposição de fibronectina, laminina e colágeno tipo IV em culturas de neuroblastoma tratadas com o sobrenadante de culturas infectadas sugerem que a modulação destes elementos poderia ser, tanto resultado direto da interação parasita/célula hospedeira, quanto conseqüência

desta interação. O parasita poderia assim interferir com a produção de fatores solúveis produzidos por células nervosas, os quais poderiam interagir com a própria célula parasitada, ou com células não-infectadas, resultando em aumento da expressão de ECM. A modulação de ECM no SNC também parece ocorrer após a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Foi demonstrado, em um estudo “*in vivo*” utilizando camundongos, que durante a fase aguda da infecção ocorre aumento da expressão de ECM em diversas regiões do SNC (Silva et al., 1999b).

Nossos resultados também sugerem que os neurônios poderiam ser um dos tipos celulares envolvidos no aumento de produção de ECM durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Foi ainda evidenciado por Silva e colaboradores (1999) que o aumento de ECM no SNC não se encontra necessariamente relacionado à presença de antígenos ou formas amastigotas do parasita. Assim, tais resultados reforçam nossa hipótese de que a modulação de ECM durante a infecção pelo *T. cruzi* poderia estar ocorrendo de forma indireta, e que isto também poderia ser observado *in vivo*.

Em experimentos realizados mais recentemente, o aumento da expressão de ECM durante a infecção pelo *T. cruzi* também foi observado em culturas primárias de astrócitos oriundos do SNC, conforme evidenciado na figura 11.

Outros tecidos e tipos celulares também apresentam modulação de ECM após a infecção pelo *T. cruzi*. Neste contexto, estudos “*in vivo*”, utilizando modelos experimentais, demonstraram um aumento de ECM no coração e no timo durante a fase aguda da infecção (Andrade et al, 1989; Savino *et al.*, 1989). Além disso, estudos “*in vitro*” desenvolvidos em nosso Laboratório demonstraram esta modulação em células epiteliais

tímicas, linhagem de fibroblastos, assim como em cultura de células adeno-hipofisárias e da cortex adrenal (Farias-de-Oliveira, 2001; Corrêa-de-Santana *et al.*, 1999).

Por outro lado, vimos que antígenos do parasita liberados em meio axênico não são capazes de modular a expressão de fibronectina, laminina ou colágeno tipo IV por células N2a. Entretanto, foi demonstrado por Pinho e colaboradores (2002) que a adsorção de antígenos do *T. cruzi* à células (linhagens de células epiteliais, musculares e fibroblastos) não-infectadas é capaz de aumentar a deposição destes componentes de ECM.

Os resultados diferentes por nós obtidos poderiam ser explicados pelos diferentes protocolos experimentais utilizados, incluindo a concentração de antígenos do *T. cruzi* adicionada às culturas celulares. Assim, não podemos descartar a hipótese de que em maiores concentrações os antígenos do parasita também poderiam modular a expressão de ECM em nosso sistema.

Considerando-se o aumento de ECM em células neuronais infectadas *in vitro* pelo *T. cruzi*, e tendo em vista a importância destes elementos nas interações celulares, poderíamos sugerir que este fenômeno implicaria em maior interação entre estas células e células do sistema imune, as quais são de fato detectadas em regiões do SNC durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Confirmando nossa hipótese, o presente trabalho mostra que a infecção *in vitro* pelo *T. cruzi* acarretou aumento da interação entre células neuronais (neuroblastoma) e células do sistema imune (esplenócitos enriquecidos em linfócitos T), evidenciando também que esta interação é, pelo menos em parte, mediada pelos elementos de ECM estudados, uma vez que o bloqueio destas moléculas com anticorpos específicos resultou em diminuição significativa do índice de adesão de esplenócitos à células N2a. Reforçando esse

conceito, cabe salientar que nosso modelo de interação neurônio/linfócito T é de natureza alogênica (N2a derivadas de um camundongo suíço e esplenócitos derivados de camundongos BALB/c), e portanto, em princípio, não envolvem interações TCR/MHC. No entanto, ainda não podemos formalmente descartar a hipótese segundo a qual a adesão células N2a/linfócitos T CD8⁺ é parcialmente mediada por interação MHC classe I/TCR. Nesse sentido, experimentos de bloqueio de adesão induzido por anticorpos anti-MHC classe I serão realizados em breve.

Ainda assim, nossos resultados sugerem que fibronectina, laminina e colágeno tipo IV também possam estar mediando estas interações *in vivo*, uma vez que a presença do infiltrado inflamatório no SNC de camundongos durante a fase aguda da infecção é observada principalmente em associação a moléculas de ECM (Silva et al., 1999a).

Por outro lado, a ausência de um bloqueio total da adesão em nossos experimentos sugere que outras moléculas possam estar mediando a interação entre células neuronais e esplenócitos. Além da hipótese (ainda que improvável) citada acima, uma possibilidade seria a interação entre ICAM-5 (expresso em neurônios) e LFA-1 (expresso em leucócitos), uma vez que a interação entre estes tipos celulares pode ser bloqueada *in vitro* com o uso de anticorpos monoclonais específicos para estas moléculas (Tian *et al.*, 2000).

O envolvimento dos ligantes e receptores de ECM nas interações celulares durante a infecção pelo *T. cruzi* foi demonstrado em nosso Laboratório, por Silva-Barbosa e colaboradores (1997). Neste trabalho, os autores usaram um modelo, no qual células T CD4⁺ obtidas do baço de animais chagásicos crônicos eram transferidas em local adjacente a um coração de animal neonato, previamente transplantado no pavilhão

auricular de receptores adultos singênicos normais (isto é, que nunca foram infectados pelo *T. cruzi*). Nesta condição experimental, ocorria destruição do tecido cardíaco transplantado; destruição esta que era bloqueada quando as orelhas eram tratadas por anticorpo monoclonal anti-laminina, ou quando os linfócitos eram tratados com anticorpo anti-receptor de laminina VLA-6. Ainda neste mesmo estudo, ficou patente que o bloqueio da interação laminina/VLA-6 gerava um acúmulo de células inoculadas fora do transplante, sugerindo fortemente bloqueio da migração celular, portanto independente de interações MHC/TCR.

Além da migração celular propriamente dita, a adesão de linfócitos a células não-linfóides pode ser mediada por ECM. Este é o caso da adesão de linfócitos tímicos a células do microambiente tímico (ver revisão Savino et al., 2002). Neste caso em particular, foi demonstrado em nosso Laboratório que o fenômeno de adesão tímócito/célula epitelial tímica é de fato mediado por ligantes e receptores de ECM, e independe da ligação MHC/TCR (Villa-Verde et al., 1994). Além disso, o fenômeno é tão conservado filogeneticamente que pode ocorrer, não apenas em situação alogênica mas também xenogênica (Moreira-Ramos, 1999).

Ao analisarmos os resultados obtidos nas diferentes condições experimentais aqui avaliadas, podemos sugerir que o aumento de ECM em culturas de células N2a (derivada de camundongo suíço) após a infecção *in vitro* propiciou uma maior interação de adesão com células T de baço proveniente de animais BALB/c normais, quando comparamos com a interação observada na ausência de infecção. Este resultado está de acordo com o conceito de que elementos de ECM participam da adesão heterocelular, e que um aumento da disponibilidade destes elementos poderia facilitar tal interação.

Vimos ainda que as co-culturas envolvendo esplenócitos provenientes de animais infectados apresentaram um maior índice de adesão quando comparado às co-culturas envolvendo esplenócitos de animais normais. Este resultado poderia ser explicado pelo aumento da expressão de receptores de ECM (VLA-4, VLA-5 e VLA-6) observada em esplenócitos de camundongos durante a fase aguda da infecção (Lima-Quaresma, 1999), o que de novo, possibilitaria uma maior interação celular.

A análise das subpopulações de linfócitos T aderidas às culturas de neuroblastoma nos permitiu perceber que a infecção acarretou maior aumento da adesão de células T CD8⁺ quando comparado à adesão de células T CD4⁺. Corroborando com os nossos resultados, foi demonstrado predomínio de células T CD8⁺ em relação às células T CD4⁺ no infiltrado inflamatório presente em regiões do SNC durante a fase aguda da infecção (Silva *et al.*, 1999a). É interessante notar que a análise fenotípica dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ aderidos evidenciou de maneira geral, aumento no percentual de células expressando alta densidade dos diferentes VLAs. Tais diferenças devem-se provavelmente ao fato de células expressando maior densidade desses receptores aderirem mais facilmente aos cultivos neuronais.

Concluimos assim que a infecção de células nervosas pelo *T. cruzi* resulta em aumento na expressão de elementos de ECM, e que tal modulação provavelmente está relacionada com alterações de adesão células do sistema imune e células nervosas.

Estas interações mediadas por ECM envolvendo células nervosas e linfócitos no contexto da infecção *T. cruzi* ainda não haviam sido evidenciadas. Neste contexto, o modelo utilizado pode ser visto como relevante para uma melhor compreensão de alguns

mecanismos celulares e moleculares possivelmente envolvidos na gênese das lesões observadas no sistema nervoso durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Considerando os nossos resultados, poderíamos sugerir que a infecção pelo *T. cruzi* resultaria em alterações na expressão de elementos de ECM no SNC, os quais poderiam também estar sendo sintetizados por neurônios e astrócitos, além de células classicamente envolvidas com a síntese destas moléculas. Além disso, a presença do *T. cruzi* no parênquima do SNC, e no interior destes e outros tipos celulares, poderia propiciar um aumento na síntese de ECM, não só das células parasitadas, mas também de outras células do microambiente. Tal fenômeno poderia decorrer da estimulação de fatores solúveis por células parasitadas, conforme sugerimos em nossos experimentos, e/ou da presença de antígenos do parasita, conforme mostrado por Pinho e colaboradores (2002).

Como se sabe, durante a fase aguda da infecção observa-se um infiltrado inflamatório no SNC, com predomínio de linfócitos T CD8⁺ (Silva et al, 1999). Tendo em vista nossos resultados, a interação de natureza adesiva de linfócitos T, particularmente com neurônios, poderia estar aumentada na vigência da infecção chagásica, sendo mediada por elementos de ECM. Poderíamos então imaginar que linfócitos T (principalmente células CD8⁺) ativados por antígenos do *T. cruzi* na periferia, uma vez presentes no SNC apresentariam maior adesividade as células neuronais, o que poderia contribuir para o reconhecimento imunológico destas células (uma vez que foi demonstrado na literatura que antígenos do *T. cruzi* apresentam um mimetismo molecular com células nervosas) e consequente lesão das mesmas.

Como consequência do infiltrado inflamatório, uma grande quantidade de citocinas estaria sendo liberada, o que poderia contribuir para a quebra de tolerância, possibilitando

que linfócitos *naive*, capazes de reconhecer antígenos próprios também fossem ativados, o que poderia contribuir para a destruição de células neuronais e de outras células do SNC.

Tais mecanismos poderiam explicar porque, apesar de raramente parasitados, e possivelmente protegidos da apoptose mediante a infecção pelo *T. cruzi*, os neurônios são lesados durante a fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Em conclusão, nosso trabalho mostra que, pelo menos em condições *in vitro*, há um envolvimento de ligantes e receptores de matriz extracelular na interação entre linfócitos T e células neuronais, interações estas que possivelmente ocorrem na infecção experimental pelo *T. cruzi in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel LC, Kalil J, Cunha-Neto E 1997. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. *Braz J Med Biol Res* 30 : 1305-1308.
- Andrade ZA & Andrade SG 1998. Doença de Chagas: In Siqueira-Batista R, Corrêa AD & Huggins DW. 1996. Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 221-226.
- Andrade SG, Grimaud JA & Stocker-Guerret S 1989. Sequential changes of the connective matrix components of the miocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *T. cruzi*. *Am J Trop Med Hygiene* 40 : 252-260.
- Andrade ZA 1999. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (1): 71-80.
- Andrade ZA 1991. Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol.* 142 : 126-129.
- Andrade ZA & Andrade SG 1998. Doença de Chagas. In: Siqueira-Batista R, Corrêa AD & Huggins DW 1996. Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.221-226.
- Aquino DA, Margolis RU, Margolis RK 1984. Immunocytochemical localization of a chondroitin sulfate proteoglycan in nervous tissue. Adult brain, retina, and peripheral nerve. *J Cell Biol* 99(3) : 1117-29.
- Arzt E, Buric R, Stelzer G *et al.* 1993. Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* 132(1) : 459-67.
- Ashwell JD, Lee FW, Vocechio MS 2000. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 18 : 309-345.

- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS *et al.* 2000. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci* 1;20(7):2427-38.
- Bazzoni G, Hemler ME 1998. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem Sci* 23(1) : 30-34.
- Bento CAM, Melo MB, Previato JO *et al* 1996. Glycoinositol-phospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. *J Immunol.* 157 : 4996-5001.
- Besedovsky HO & Del Rey A 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Rev* 17(1):64-102.
- Besedovsky HO & Del Rey A 2000. The cytokine-HPA axis feed-back circuit. *Z Rheumatol* ; 59 Suppl 2:II/26-30.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. 1973. *Annu Rev Microbiol* ;27:347-82
- Brener Z and Gazzinelli RT 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114 : 103-110.
- Canning DR, Hoke A, Malemud CJ, Silver J 1996. A potent inhibitor of neurite outgrowth that predominates in the extracellular matrix of reactive astrocytes. *Int J Dev Neurosci* 14 : 153–175.
- Carr MW, Alon R, Springer TA 1996. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity* 4(2) :179-187.
- Chaves CAA, Al-Sabbagh A, Sakuraba JK *et al.* 1993. Autoimmune response to myelin basic protein in experimental Chagas` disease. XVIII Congresso Brasileiro de Imunologia. Águas de Lindóia. Resumo 12055.

- Chuenkova MV & Pereira MA 2000. A Trypanosomal Protein Synergises with the Cytokines Ciliary neurotrophic factor and leukemia Inhibitory Factor to Prevent Apoptosis of Neuronal Cells. *Mol Biol Cell*. 11 : 1487-1498.
- Chuenkova MV, Furnari FB, Cavenee WK *et al.* 2001. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: A potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-Kinase AKT signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 14; 98 (17) : 9936-41.
- Corrêa AD, Miranda-Filho N, Siqueira-Batista R *et al.* 1996. Epidemiologia. In: Siqueira-Batista R, Corrêa AD & Huggins DW 1996. *Moléstia de Chagas*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p.17-39.
- Corrêa-de-Santana, E 1999. Influência da infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* sobre o eixo hipófise-adrenal em camundongos. Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.
- Cossio PM, Laguens RP, Diez C *et al.* 1974. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50 (6): 1252-1259.
- Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Mendes-da-Cruz, DA *et al.* 2001. Altered thymocyte migration following acute *Trypanosoma cruzi* infection: relationship to intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors (submetido à publicação).
- Cotta-de-Almeida V, Bertho AL, Villa-Verde DMS & Savino W 1997. Phenotypic and functional analysis of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Immunol Immunopathol* 82 : 125-132.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L *et al.* 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* Crossreactive T cell clones in

heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest 98 : 1709-1712.

- Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A *et al.* 1995. Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci 92 : 3541-3545.
- Da Mata JR, Camargos ERS, Chiari E, Machado CRS 2000. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. Brain Res Bull 53(2) : 153-162.
- Dalmau SR, Freitas CS, Savino W. 1999 Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. J Clin Invest 103(3): 974-90.
- Davies JM 1997. Molecular mimicry: can epitope mimicry induce autoimmunity disease? Immunol Cell Biol 75 : 113-126.
- Davies SJ, Goucher DR, Doller C, Silver J 1999. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. J Neurosci 19:5810 - 5822.
- Davies SJ, Silver J 1998. Adult axon regeneration in adult CNS white matter. Trends Neurosci 21 : 515.
- De Meis, J 1998. Expressão diferencial de CD44 em órgãos linfóides secundários de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Rio de Janeiro, RJ.
- De Souza M, Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW 1991. Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. Immunol Today 12 : 262.

- Diamond MS, Springer TA 1994. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* 4(6) : 506-517.
- Dos Reis GA 1999. The role of tissue-infiltrating T cells in immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (1): 279-280.
- Eisen H & Hahn S 1991. Mimicry in *Trypanosoma cruzi*- fantasy and reality. *Curr Opin Immunol* 3 : 507-510.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi SE 2000. The sympathetic nerve- an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52 : 595-638.
- Epler JA, Liu R, Shimizu Y 2000. From the ECM to the cytoskeleton and back: how integrins orchestrate T cell action. *Dev Immunol* 7(2-4) : 155-170.
- Farias-de-Oliveira, DA 1999. Participação de componentes da matriz extracelular na infecção *in vitro* de células epiteliais tímicas pelo *Trypanosoma cruzi*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Rio de Janeiro, RJ.
- Fawcett JW, Asher RA 1999. The glial scar and CNS repair. *Brain Res Bull* 49 : 377–391.
- Felten DL, Felten SY, Carlson SL *et al.* 1985. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol.* 135:755–765.
- Fidler PS, Schuette K, Asher RA *et al.* 1999. Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci* 19 : 8778–8788.
- Fitch MT, Silver J 1997. Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration. *Cell Tissue Res* 290 : 379–384.

- Garcia-Abreu J, Mendes FA, Onofre GR *et al.* 2000. Contribution of heparan sulfate to the non-permissive role of the midline glia to the growth of midbrain neurites. *Glia* 29 : 260-272.
- Gazzinelli RT, Hieni S, Wynn TA *et al.* 1993. Interleukin-12 is required for T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci* 90 : 6115-6119.
- Gilat D, Cahalon L, HersHKoviz R, Lider O 1996. Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix. *Immunol Today* 17(1): 16-20.
- Gomes FCA, Garcia-Abreu J, Galou M *et al.* 1999. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. *Glia* 26 : 97-108.
- Gordon DS, Sergeeva VE, Golubeva NN 1978. Activity and distribution of biogenic amines in thymus and spleen structures following administration of iso- and heterologous erythrocytes. *Biull Eksp Biol Med* 86(8) : 245-247.
- Grazzinelli RT, Brener Z 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagás disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114:103-110.
- Higuchi ML, Brito T, Reis MM. *et al.* 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol* 2 : 101-106.
- Hoff R, Teixeira RS, Carvalho JS, Mott KE 1978. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagás disease. *New Engl J Med* 296 : 604-606.

- Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G *et al* 1987. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur J Immunol* 17(7) : 1027-1033.
- Hynes R 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 (6) : 673-687.
- Ivaska J, Heino J 2000. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 20;57(1):16-24.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S *et al.* 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48 : 348-357.
- Jones LL, Tuszynski MH 2002. Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by oligodendrocyte progenitors, reactive microglia and macrophages. *J Neurosci*, "in press".
- Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB *et al.* 2002. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is secreted by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci* 22 : 2792–2803.
- Julius MH, Simpson E & Herzenberg LA 1973. A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol.* 3 : 645-649.
- Kalil J & Cunha-Neto E 1996. Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today* 12 : 396-399.
- Khoury EL, Ritacco V, Cossio PM. *et al.* 1979. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin Exp Immunol* 36(1) : 8-15.
- Kierszenbaum F. 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin*

Microbiol Rev 12(2) : 210-223.

- Klebe R.J. & Ruddle FH 1969. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. J Cell Biol 43 : 69A.
- Krautz GM, Kissinger JC & Krettli AU 2000. The target of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today 16(1) : 31-34.
- Kohm AP, Sanders VM 1999. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. J Immunol 1;162(9):5299-308.
- Lagrota-Candido JM, Villa-Verde DM, Vanderlei FH *et al.* 1996. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. V. Interferon-gamma modulates thymic epithelial cell/thymocyte interactions via extracellular matrix ligands and receptors. Cell Immunol 15;170(2):235-44
- Lannes-Vieira J, Chammas R, Villa-Verde DM *et al* 1993. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. Int Immunol;5(11):1421-30
- Leite-De-Moraes MC, Coutinho A, Hontebeyrie-Joskowicz M. *et al.* 1994. Skewed V β TCR repertoire of CD8+ T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection. Int Immunol. 6 : 387-392.
- Leite-De-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Le Boulenger F *et al.* 1991. Studies on the thymus in Chagas' disease II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. J Immunol. 33 : 267-275.

- Lider O, Hershkoviz R, Kachalsky SG 1995. Interactions of migrating T lymphocytes, inflammatory mediators, and the extracellular matrix. *Crit Rev Immunol* 15(3-4):271-83
- Lima-Quaresma, KRF 1999. Ligantes e receptores de matriz extracelular nos órgãos linfóides periféricos de camundongos submetidos à infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*: estudos histológicos, histoquímicos e citofluorimétricos. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Rio de Janeiro, RJ.
- Lopes, AF & Ribeiro-dos-Santos, R 1979. Route of granulocytes in Chagas` disease. In: *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*, Rio de Janeiro p.189.
- Losavio AS, Sica REP, Sanz OP *et al.* 1993. Functional stages of the sciatic nerve in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 53 : 129-32.
- Lundberg JM, Hemsén A, Rudehill A. *et al.* 1988. Neuropeptide Y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: Localization, binding characteristics, cyclic AMP effects and functional responses in control and denervated animals. *Neuroscience* 24 : 659–672.
- Maggiano N, Piantelli M, Ricci R *et al.* 1994. Detection of growth hormone-producing cells in human thymus by immunohistochemistry and non-radioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 42 (10) : 1349-1354.
- Marcos MAR, Toribio ML, De-La-Hera A *et al.* 1988. Mutual cell interaction and the selection of immune repertoires. *Immunol Today* 9 : 204-207.
- Maslinski W, Kullberg M, Nordstrom O, Bartfai T 1988. Muscarinic receptors and receptor-mediated actions on rat thymocytes. *J Neuroimmunol* 17(4) : 265-274.
- McGeer, PL & McGeer EG 1995. The inflammatory response system of the brain: implications for therapy of Alzheimer and others neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 21(2) : 195-218.

- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS *et al.* 1991. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci* 11 : 3398–3411.
- Mello-Coelho V, Villa-Verde DMS, Dardenne M *et al.* 1997. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. *J Neuroimmunol* 76: 39-49
- Mendes-da-Cruz DA 2000. Análise fenotípica de linfócitos T CD4+CD8+ em linfonodos subcutâneos de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de mestrado pela Biologia Parasitária , Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,RJ.
- Minóprio P, Coutinho A, Joskowics M *et al.* 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocyte. *Scand J Immunol* 24 : 669-679.
- Minóprio P, Eisen H, Forni L *et al.* 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. I. Quantification of both T and B response. *Scand J Immunol* 24:661-668.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C *et al.* 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-non-specific responses and the activation of TcRIT cells. *Immunol Rev* 112: 183-207.
- Minoprio P 2001. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *International J Parasitol* 31: 588-591.
- Minoprio P, Bandeira A, Pereira P *et al.* 1989. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4-CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *Int Immunol* 1 : 176-184.

- Mucci J, Hidalgo A, Moceti E 2002. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. Proc Natl Acad Sci 99(6) : 3896-3901.
- Nagano N & Kelly PA 1994. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. J Biol Chem 269(18) : 13337-13345.
- Novak U & Kaye AH 2000. Extracellular matrix and the brain: components and function. J Clin Neurosci 7(4) : 280-290.
- Olivares-VillaGomez D, McCurley TL, Vnencak-Jones CL *et al.* 1998. Polymerase chain reaction amplification of the three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. Am J Trop Med Hyg 59 : 563-570.
- OMS [on line]. Health topics: Chagas' disease. Endereço eletrônico: <http://www.who.int>, consultado em março de 2001.
- Palomino SA, Aiello VD & Higuchi ML 2000. Systematic mapping of hearts from chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. Ann Trop Med Parasitol 94 : 571-579.
- Pentreath, VW 1995. Trypanosomiasis and the nervous system. Pathology and immunology. Trans R Soc Trop Med Hyg 89(1) : 9-15.
- Petry K & Van Voorhis WC 1991. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissue: investigation of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. Res Immunol 142(2) : 151-156.

- Pinho RT, Vannier-Santos MA, Alves CR *et al.* 2002. Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. *Acta Tropica* 83 : 103-115.
- Pittella JEH, Meneguette C, Barbosa AJA *et al.* 1990. Histopathological and immunohistochemical study of the brain in the acute and chronic phases of experimental trypanosomiasis in dog. *Ann Trop Med Parasitol* 84 : 615-621.
- Pittella, JEH 1993. Central nervous system in Chagas`disease. An updating. *Rev Inst Med Trop* 35(2): 111-116.
- Pittella, JEH 1991. Central nervous system involvement in experimental trypanosomiasis cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 : 141-145.
- Powell EM, Fawcett JW, Geller HM 1997. Proteoglycans provide neurite guidance at an astrocyte boundary. *Mol Cell Neurosci* 10 : 27-42.
- Prata A 1994. Chagas`disease. *Infec Dis Clin N Am* 8(1) : 61-76.
- Pires Neto MA, Braga-de-Souza S, Lent R 1999. Extracellular matrix molecules play diverse roles in the growth and guidance of central nervous system axons. *Braz J Med Biol Res* 32(5) : 633-638.
- Queiroz AC 1975. Encefalomielite chagásica experimental em cães. *Rev Pat Trop* 4(4) : 95-101.
- Queiroz AC 1973. Tumor-like lesion of the brain caused by *Trypanosoma cruzi*. *Amer J Trop Med Hyg* 22 : 473-476.
- Ramer-Quinn DS, Swanson MA, Lee WT *et al.* 2000. Cytokine production by naive and primary effector CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *Brain Behavior and Immunity* 14 : 239-255.

- Reichardt LF, Tomaselli KJ 1991. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14 : 531-70.
- Reina-San-Martin B, Cosson A, Minóprio P 2000a. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today* 16 : 62-67.
- Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C *et al.* 2000b. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosoma is a eukaryotic prolin racemase. *Nat Med.* 6(8) : 890-897.
- Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA *et al.* 1997. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 83 : 165-172.
- Ribeiro dos Santos R, Laus JL, Silva JS *et al.* 1992. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 175 : 29-39.
- Ribeiro dos Santos R, Marquez JO, Von Gal Furtado CC *et al.* 1979. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed Parasitol.* 30(1) : 19-23.
- Ribeiro-dos Santos R, Mengel JO, Postol E *et al.* 2001. A heart specific CD4+ T cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 23(2) : 93-101.
- Rivest S 2001. How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 26 (8) : 761-788.
- Rutka JT, Apodaca G, Stern R *et al.* 1988. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg* 69(2) : 155-170.

- Sanders VM, Baker RA, Ramer-Quinn DS *et al.* 1997. Differential expression of the beta2-adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: Implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 158 : 4200–4210.
- Savino W, Arzt E, Dardenne M 1999. Immunoneuroendocrine connectivity? The paradigm of the thymus-hypothalamus/pituitary axis. *Neuroimmunomodulation* 6(1-2) : 126-136.
- Savino W, Dardenne M 2000. Neuroendocrine control of the thymus physiology. *Endocr Rev* 21(4) : 412-443.
- Savino W, Dalmau SR & Cotta-de-Almeida V 2000. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol* 7 (2-4) : 279-291.
- Savino,W, Leite-de-Moraes, MC, Hontebeyrie-Joskowicz M *et al.* 1989. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymus microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol* 19(9) : 1727-1733.
- Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS *et al.* 2002. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* 23(6) : 305-313.
- Schmeissner PJ, Xie H, Smilenov LB *et al* 2001. Integrin function play a key role in the differentiation of thymocytes in vivo. *J Immunol* 167 : 3714-3724.
- Shimizu Y, Hunt SW 1996. Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol Today* 17(12) : 565-573.
- Shimizu Y & Shaw S 1991. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J* 5 : 2292-2299.

- Shimizu Y, Van Seventer GA, Horgan KJ *et al.* 1990. Regulated expression and function of three VLA (β 1) integrin receptors on T cell. *Nature* 345 : 250-253.
- Silva AA 1996. Contribuição para a caracterização das alterações imunopatológicas presentes no sistema nervoso central durante a infecção chagásica experimental.. Dissertação de Mestrado no programa de Patologia Experimental da Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ.
- Silva AA, Roffê E, Marino AP *et al.* 1999a. Chagas`disease encephalites: intense CD8+ lymphocytic infiltrates is restricted to the acute phase, but is not related to the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol* 92 : 56-66.
- Silva AA, Roffê E, Lannes-Vieira J 1999b. Expression of extracellular matrix components and their receptor in the central nervous system during experimental toxoplasma gondii and trypanosoma cruzi infection. *Braz J Med Biol Res* 32 : 593-600.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH *et al.* 1992. Interleukin-10 and interferon gamma regulation of experimental *T.cruzi* infection. *J Exp Med* 175 : 169-174.
- Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA *et al.* 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 63 : 4862-4867.
- Silva-Barbosa SD, Cotta-de Almeida V, Riederer I *et al.* 1997. Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol* 159 : 997-1003.
- Siqueira-Batista R, Quintas LEM, Vahia-Loureiro 1996. O *Trypanosoma cruzi*. In: Siqueira-Batista R, Corrêa AD & Huggins DW . *Moléstia de Chagas*. Rio de Janeiro:

Cultura Médica , p.40-52.

- Smith GM, Miller RH, Silver J 1986. Changing role of forebrain astrocytes during development, regenerative failure, and induced regeneration upon transplantation. *J Comp Neurol* 251 : 23–43.
- Soares MBP, Pontes-de Carvalho L & Ribeiro-dos –Santos R 2001. The pathogenesis of Chagas`disease: when autoimmune and parasite-specific immune response meet. *An. Acad Bras Ciênc* 73 (4):
- Spinella S, Liegeard P, Hontebeyrie-Joskowicz, M 1992. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas`disease. *Exp Parasitol* 74 : 46-56,.
- Stichel CC, Muller HW 1998. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res* 294(1) : 1-9.
- Swanson MA, Lee WT, Sanders VM 2001. IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *J Immunol* 166(1) : 232-240.
- Tafuri, WL 1987. Patogenia da Doença de Chagas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 29 : 194-199.
- Takayama E, Kina T, Katsura Y *et al.* 1998. Enhancement of activation-induced cell death by fibronectin in murine CD4+ CD8+ thymocytes. *Immunol* 95 : 553-558.
- Tanowitz HB, Brosnan C, Guastamacchio D *et al.* 1982. Infection of organotypic cultures of spinal cord and dorsal root ganglia with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 31 : 1090-1097.

- Tanowitz HB; Kirchoff LV; Simon D *et al.* 1992. Chagas' Disease. *Clin Microbiol. Rev* 5 : 400-419.
- Tanzer ML 1989. Collagens and elastin: structure and interactions. *Curr Opin Cell. Biol* 1: 968-973.
- Tarleton, RL, Grusby MJ & Zhang L 2000. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 165 : 1520-1525.
- Tarleton RL & Zhang L 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15(3) : 94-99.
- Tarleton RL, Zhang L & Downs MO 1996. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to host infected tissue. *Proc Natl Acad Sci* 94 : 3832-3937.
- Tian L, Kilgannon P, Yoshihara Y 2000. Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18. *Eur. J. Immunol.* 30(3) : 810-818.
- Torrico F, Heremans H, Rivera MT *et al.* 1991. Endogenous IFN-gama is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 146 : 3626-3632.
- Tuszinski MH, Grill R, Jones LL *et al.* 2002. Spontaneous and augmented growth axons in the primate spinal cord: effects of local injury and nerve growth factor-secreting cell grafts. *J Comp Neurol* 449 : 88-101.
- Umekita FL & Mota I 2000. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T.cruzi*. *Braz. J Med Biol Res* 33 (3): 253-258.
- Vaday GG & Lider O 2000. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes:

- dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol.* 67: 149-159.
- Van Voorhis WC & Eisen H 1989. F1-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissues. *J Exp Med* 169 : 641-652.
 - Van Voorhis WC, Barret L, Koelling R *et al.* 1993. F1-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain 2 distinct epitopes that mimic nervous tissues. *J Exp Med* 178 : 681-694.
 - Varon S, Skaper SD, Barbin G *et al.* 1984. Low molecular weight agents support survival of cultured neurons from the central nervous system. *J. Neurosci* 4(3) : 654-658.
 - Venstrom KA, Reichardt LF 1993. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 7(11) : 996-1003.
 - Villa-Verde DM, Lagrota-Candido JM, Vannier-Santos MA *et al.* 1994. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. IV. Modulation of thymic nurse cells by extracellular matrix ligands and receptors. *Eur J Immunol.* 24(3) : 659-664.
 - Villela E & Villela E 1932. Elementos do sistema nervoso central parasitados pelo *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 26 : 77-79.
 - Vindelov LL 1977. Flow Microfluorometric Analysis of nuclear DNA in cell from solids tumor and cell suspension.. A new method for rapid isolation and staining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol* 24 : 227-242.
 - Weihe E, Muller S, Fink T *et al.* 1989. Tachykinins, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y in nerves of the mammalian thymus: Interactions with mast cells in autonomic and sensory neuroimmunomodulation? *Neurosci Lett* 100 : 77-82.
 - Weihe E, Nohr D, Michel S *et al.* 1991. Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int J Neurosci* 59 : 1-23.

- Yamada A, Nikaido T, Nojima Y *et al.* 1991. Activation in human CD4+ T Lymphocyte: intercation of fibronectin with VLA-5 receptor in CD4 cells induces the AP-1 transcription factor. *J Immunol* 146 : 53.
- Zhang L & Tarleton RL 1996. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between suscepibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 26 : 102-109.