ANDRÉ LUIS BOMBEIRO

**ESTUDOS NEUROIMUNOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS
EXPERIMENTAL. ANÁLISES HISTOMOLECULARES DA
MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES
E DEFICIENTES EM IL-12 E IL-23 INFECTADOS COM
TRYPANOSOMA CRUZI DA CEPA SYLVIO X10/4**

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

ANDRÉ LUIS BOMBEIRO

**ESTUDOS NEUROIMUNOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS
EXPERIMENTAL. ANÁLISES HISTOMOLECULARES DA
MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS IMUNOCOMPETENTES
E DEFICIENTES EM IL-12 E IL-23 INFECTADOS COM
TRYPANOSOMA CRUZI DA CEPA SYLVIO X10/4**

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig
Co-orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bombeiro, André Luis.

Estudos neuroimunológicos da doença de Chagas experimental.
Análises histomoleculares da medula espinal de camundongos
imunocompetentes e deficientes em IL-12 e IL-23 infectados com
Trypanosoma cruzi da cepa Sylvio X10/4 / André Luis Bombeiro. --
São Paulo, 2011.

Orientador: Jose Maria Alvarez Mosig.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:
Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia da doença de Chagas
experimental.

Versão do título para o inglês: Neuroimmunological studies of
experimental Chagas' disease. Histomolecular analysis of the spinal
cord of immunocompetent and immunodeficient mice that have been
infected with parasites of Sylvio X10/4 strain of *Trypanosoma cruzi*

Descritores: 1. *Trypanosoma cruzi* 2. Sistema Nervoso Central 3.
Inflamação 4. Interferon Tipo II 5. Óxido Nítrico 6. Doença de
Chagas I. Mosig, Jose Maria Alvarez II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0111/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Luis Bombeiro.

Título da Tese: Estudos neuroimunológicos da doença de Chagas experimental. Análises histomoleculares da medula espinal de camundongos imunocompetentes e deficientes em IL-12 e IL-23 infectados com *Trypanosoma cruzi* da cepa Sylvio X10/4.

Orientador(a): Jose Maria Alvarez Mosig.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) **Aprovado(a)**

( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cepb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **140** nas fls. **94** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Maria Álvares Mosig, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi clone Sylvio X10/4: Mecanismos envolvidos no controle do parasita e na patologia cardíaca crônica** do qual participam o(s) alunos **André L. Bombeiro, Christian E. Jorquera-Rosas, Giovana Giacomini, Rafael Moyses Salgado**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **23.11.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

“Pelos erros dos outros,
o homem sensato corrige os seus”
Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig, pela excelente orientação oferecida, pelo entusiasmo, otimismo e incentivo no desenvolvimento desta tese. A ele, sou muito grato por permitir que eu pudesse optar como seguir adiante, sem se preocupar com os seus interesses próprios, mas sim com o meu contentamento profissional;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Gerson Chadi (Faculdade de Medicina da USP), pelo apoio fundamental na elaboração desta tese, por sua dedicação mais profunda, por seus ensinamentos e, acima de tudo, pelo exemplo de profissionalismo com o qual conduz suas pesquisas;

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas desta e seu Departamento de Imunologia, pela oportunidade em cursar o Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia, contribuindo, assim, para a minha capacitação profissional;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela bolsa de doutorado-direto concedida (Processo nº 2006/53116-2) e ao assessor do meu projeto de pesquisa, cujas sugestões foram de grande valia para a melhoria deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela bolsa concedida por meio do Programa de Doutorando no Brasil com Estágio no Exterior (Processo: BEX 4611/09-8) para a realização de um estágio sanduíche na Alemanha;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pela bolsa concedida no início do curso (Processo nº 141818/2006-9) e pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa;

Ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE – da USP pela bolsa concedida para a realização de estágio docente junto à disciplina Imunologia Básica (BMI-295), sob supervisão da Profa. Dra. Maria Regina D’Império Lima;

À Profa. Dra. Maria Regina D’Império Lima (ICB/USP), pela inestimável colaboração ao meu trabalho, principalmente quanto às discussões e valiosas sugestões;

Ao Prof. Dr. Harald Neumann (Instituto de Neurobiologia Reconstitutiva da Universidade de Bonn, Bonn, Alemanha), por me aceitar em seu grupo de pesquisa para a realização de um estágio em neuroimunologia, do qual trago não apenas o aprendizado de bancada, mas também um grande exemplo de competência e profissionalismo a ser seguido;

Ao Prof. Dr. Carlos Penha Gonçalves (Instituto Gulbenkian de Ciência – IGC – Oeiras, Portugal), pelo estágio referente ao projeto de identificação de genes envolvidos no desenvolvimento da doença de Chagas experimental;

Aos demais colaboradores do nosso grupo de pesquisa, Prof. Dr. Cláudio R. F. Marinho (ICB/USP), Profa. Dra. Debora R. F. Chadi (IB/USP), Profa. Dra. Sanae Kasahara (UNESP, Rio Claro), Dra. Teresa Pais (IMM, Portugal) e Profa. Dra. Merari F. R. Ferrari (FMUSP);

À Banca de qualificação desta tese, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara (ICB/USP), Profa. Dra. Ises Abrahamson (ICB/USP) e Profa. Dra. Michele Schultz (EACH/USP) pelas sugestões para a melhoria deste trabalho;

Ao corpo docente do ICB e IB da USP pelas disciplinas cursadas, que muito contribuíram para a minha formação profissional;

Aos funcionários do Biotério de Camundongos Isogênicos do ICB da USP, em especial à Dra. Regina De Luca e à Dra. Silvia Massironi;

Aos funcionários do Departamento de Imunologia do ICB/USP, em especial à Jotelma L. Ribeiro, Amanda Souza, Maria Eni S. Santos e Amarildo Utiana (*in memoriam*)

Aos alunos, pós-doutores e técnicos dos laboratórios de Imunologia das Doenças Parasitárias (Chagas e Malária) do ICB/USP, Sheyla I. Castillo Méndes, Sérgio M. Rodriguez Málaga, Luis R. Sardinha, Sandra M. Muxel, Ana Paula F. Rosário, Fernando D. Pretel, Ricardo M. Santos, Daniella Z. Bucci, Luiz N. Nuñez Apaza, Eduardo P. Amaral, Érica M Salles, Genoilson B. Alves, Henrique B. Silva, Raquel H. Panatieri, Rafael M. Salgado, Giovana Giacomini, Beatriz Villas Bôas, Fernanda Naomi e Rogério Silva do Nascimento, pelo companheirismo e discussões científicas;

Aos alunos e funcionários do laboratório de Neurocirurgia Experimental (LIM-45) da Faculdade de Medicina da USP, Susana C. L. Telles, Rebeca B. Cecatto, Andreas Betz, Bianca A. de Luca, Camila Silva, Beatriz F. A. Levy, Rafaela F. Pestana, Gabriela P. Oliveira, Juliana P. Costa, Jinger C. Cunha, Sarah Gomes, T. Florence Dinucci e Gilmar, pela amizade, companheirismo e valiosas discussões e sugestões que tanto contribuíram para este trabalho;

Aos alunos, pós-doutandos e técnicos do laboratório de Regeneração Neural da UniBönn, Bettina Linnartz, Liviu Bodea, Yiner Wang, Janine Claude, Céline Ruegsegger, Jens Kopatz, Clara Buetner, Johannes Ackermann, Kristin Roy, Jessica Schumacher, Rita Hass, Kerstin von Kolontaj pela amizade e dedicação despendidas comigo durante o tempo em que estive em seu país;

À Lúcia A. Gonçalves (IGC, Portugal), pela inestimável ajuda nos procedimentos de PCR em tempo real e subsequente análise de dados. Agradeço também ao carinho e atenção despendidos comigo no período em que afortunadamente estive em sua terra;

Aos grandes amigos do ICB/USP, Christian E. R. Jorquera, L. Alexandra Cifuentes Muños, Cláudia A. Zago, Meire I. Hiyane, Rosa M. Elias e Renato Barbosa, e da FM-USP, Jessica R. Maximino e Tatiana Doubles, pelo companheirismo, pelos conselhos, pelos momentos de descontração e pelas frutuosas discussões que tanto contribuíram para a minha formação pessoal e profissional;

Ao Prof. Dr. Hércules Menezes (UNESP, Rio Claro) pelo grande apoio e incentivo em cursar o doutorado neste Departamento. A ele também sou grato pelos conselhos e pelas calorosas discussões que tanto acrescentaram à minha formação profissional;

À Vanessa Nunes de Paiva, Daniela M. Leme e Anna Uristiki pela grande amizade, carinho, apoio e pelos inúmeros momentos de descontração ao longo desses anos;

Ao J. Reinaldo C. Campos, pelo auxílio na obtenção de fotomicrografias e redação de trabalho. A ele também sou muito grato por toda a amizade, companheirismo, prestividade, apoio, incentivo e carinho;

A toda a família Campos, em especial à D. Cida pelo carinho com que sempre me recebeu em sua casa;

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Elisete e Flamarion e ao meu irmão Everton. A eles sou grato por todo o amor, apoio e exemplo de determinação e coragem.

RESUMO

Bombeiro, AL. Estudos neuroimunológicos da doença de Chagas experimental. Análises histomoleculares da medula espinal de camundongos imunocompetentes e deficientes em IL-12 e IL-23 infectados com *Trypanosoma cruzi* da cepa Sylvio X10/4 [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O estabelecimento de uma resposta TH1 com a produção de IL-12, IFN-gama e de óxido nítrico é crucial no controle do *Trypanosoma cruzi*, o qual pode colonizar o SNC de crianças e pacientes imunossuprimidos. A inflamação exacerbada em decorrência da persistência de um estímulo antigênico gera o acúmulo de substâncias potencialmente citotóxicas, como mediadores pró-inflamatórios e radicais livres. A partir da infecção de camundongos imunodeficientes (IL-12p40KO) com *T. cruzi* Sylvio X10/4, avaliamos os danos causados à medula espinal com enfoque na inflamação e neurodegeneração. Além da desmielinização, alta reatividade glial e morte de neurônios no ponto mais tardio da doença, constatamos uma baixa produção de mediadores inflamatórios nas primeiras semanas após a infecção, acompanhada pela proliferação ascendente do parasita no tecido nervoso. Acreditamos que um atraso na produção de IFN-gama seja responsável pela ativação tardia ou ineficiente dos fagócitos da medula espinal, favorecendo a disseminação descontrolada do protozoário e subsequentes danos teciduais.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. SNC. Inflamação. IL-12. IFN-gama. Neurodegeneração.

ABSTRACT

Bombeiro, AL. Neuroimmunological studies of experimental Chagas' disease. Histomolecular analysis of the spinal cord of immunocompetent and immunodeficient mice that have been infected with parasites of Sylvio X10/4 strain of *Trypanosoma cruzi*. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo (Brazil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The establishment of a TH1 response with IL-12, IFN-gamma and nitric oxide production is crucial for controlling the proliferation of *Trypanosoma cruzi*, which may colonize the CNS of children and immunosuppressed hosts. The exacerbated inflammation due to the persistence of an antigenic stimulus results on the accumulation of potentially cytotoxic substances, such as pro-inflammatory mediators and free radicals. By the infection of immunodeficient mice (IL-12p40KO) with *T. cruzi* Sylvio X10/4 parasites we evaluated the spinal cord damages, focusing on the inflammation and neurodegeneration. Besides demyelization, high glial reactivity and neuron death at the latest stage of the disease, we noticed low production of inflammatory mediators during the first weeks of the infection, accompanied by an ascendant parasite proliferation in the nervous tissue. We believe that a delay on IFN-gamma production is responsible for the late or inefficient phagocyte activation in the spinal cord, contributing to the uncontrolled protozoan proliferation and subsequent tissue injury.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. CNS. Inflammation. IL-12. IFN-gamma. Neurodegeneration.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1 A Doença de Chagas.....	13
1.1 Etiologia, fases, formas e manifestações clínicas.....	13
1.2 Reativação da doença de Chagas no sistema nervoso central.....	15
2 A Resposta Imune na Doença de Chagas.....	16
3 O comprometimento do sistema nervoso central de camundongos deficientes em IL-12 e IL23, infectados com <i>T. cruzi</i> da cepa SylvioX10/4.....	17
II OBJETIVOS.....	20
III CAPÍTULO I.....	21
Resumo.....	21
1 Introdução.....	22
2 Materiais e Métodos.....	24
2.1 Animais, parasitas e infecção.....	24
2.2 Eutanásia.....	24
2.3 Preparo tecidual, seccionamento e amostragem.....	25
2.4 Procedimentos de imunoistoquímica para a localização de proteínas.....	25
2.5 Análise estereológica.....	26
2.6 Análise semi-quantitativa de imagem por microdensitometria/morfometria.....	27
2.7 Análise estatística.....	27
3 Resultados.....	28
3.1 Lesões na medula espinal de camundongos IL-12p40KO infectados com <i>T. cruzi</i>	28
3.2 Perfis de imunorreatividade.....	31
4 Discussão.....	38
IV. CAPÍTULO II.....	42
Resumo.....	42
Sinopse.....	43
1 Introdução.....	44
2 Materiais e Métodos.....	45
2.1 Camundongos, parasitas e infecção.....	45
2.2 Avaliação comportamental.....	46
2.3 Preparo tecidual, seccionamento e amostragem.....	47
2.4 Procedimentos de imunoistoquímica.....	48

2.5 <i>Análise semi-quantitativa de imagem por microdensitometria/morfometria</i>	49
2.6 <i>Análise estereológica</i>	50
2.7 <i>Quantificação relativa de mRNA via RT-PCR em tempo real</i>	51
2.8 <i>Análise estatística</i>	51
3 Resultados	52
3.1 <i>Condições gerais e avaliação comportamental</i>	52
3.2 <i>Inflamação na medula espinal</i>	55
3.3 <i>Neurodegeneração e desmielinização na medula espinal</i>	58
3.4 <i>Populações de microglias e astrócitos na medula espinal dos camundongos infectados com T. cruzi</i>	63
4 Discussão	66
V CAPÍTULO III	72
Resumo	72
1 Introdução	73
2 Materiais e Métodos	74
2.1 <i>Camundongos, parasitas e infecção</i>	74
2.2 <i>Avaliação clínica e eutanásia</i>	75
2.3 <i>Análise histopatológica</i>	75
2.4 <i>Quantificação relativa do mRNA por RT-PCR em tempo real</i>	75
2.5 <i>Cultura de microglias</i>	76
2.6 <i>Infectividade das microglias pelo T. cruzi</i>	77
2.7 <i>Deteção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas microgliais</i>	77
2.8 <i>Análise estatística</i>	77
3 Resultados	78
3.1 <i>Parasitemia, danos motores e parasitismo cardíaco</i>	78
3.2 <i>Parasitismo na medula espinal</i>	82
3.3 <i>Inflamação na medula espinal</i>	83
3.4 <i>Infectividade microglial e capacidade de destruição do parasita</i>	86
3.5 <i>Produção de óxido nítrico</i>	89
4 Discussão	90
VI CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
REFERÊNCIAS	95

I INTRODUÇÃO GERAL

1 A Doença de Chagas

1.1 Etiologia, fases, formas e manifestações clínicas

Em 1909, Carlos Chagas descreveu uma nova tripanossomíase humana (Chagas, 1909), que anos mais tarde passou a ser conhecida como a doença de Chagas. Trata-se de uma doença reconhecidamente negligenciada (Hotez et al., 2007), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Segundo dados da Organização Pan Americana de Saúde – OPAS – estima-se que cerca de 7,7 milhões de pessoas em toda a América Latina sejam portadoras da doença, sendo que 20% da população local encontram-se sob risco de infecção (OPAS, 2006, apud RASSI et al., 2010). Tal doença é transmitida ao homem, bem como a uma vasta gama de mamíferos domésticos e selvagens, através de insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo que as espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as mais relacionadas ao contágio humano (WHO, 2002).

O *T. cruzi* é altamente pleomórfico, exibindo formas distintas no hospedeiro humano e no inseto vetor. Durante seu ciclo de vida, as formas sanguícolas tripomastigotas, ingeridas pelo vetor, transformam-se em epimastigotas e replicam-se por fissão binária no estômago do inseto. Em seguida, migram para a porção distal do intestino onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, a forma infectante do protozoário. Durante o repasto alimentar noturno, o triatomíneo defeca sobre a pele do hospedeiro, depositando os tripomastigotas metacíclicos que, por sua vez, são carregados para dentro do organismo quando o indivíduo coça o local da ferida deixada pelo inseto. Os parasitas invadem as células do hospedeiro e, no citoplasma, se diferenciam em amastigotas, a forma proliferativa. Após a replicação dos amastigotas por fissão binária, ocorre a transformação deles em tripomastigotas. Sucede-se a lise celular e os parasitas se disseminam pelo tecido, podendo ganhar a corrente sanguínea e infectar novos tecidos ou mesmo serem ingeridos por outro inseto, fechando o ciclo (Chagas, 1909; Rassi et al., 2010). Além dos mecanismos vetoriais, são conhecidos outros meios de transmissão da doença de Chagas, dentre os quais a transfusão sanguínea, a transmissão congênita, a transmissão por transplante de órgãos infectados e, mais raramente, a transmissão por ingestão oral de alimentos contaminados com *T. cruzi* ou por acidentes de laboratório (Rassi et al., 2010).

No homem, os tripomastigotas são capazes de invadir diferentes células, sendo que geralmente apresentam um tropismo particular pelas células da musculatura cardíaca, esquelética e lisa (Junqueira et al., 2010). Em termos de patogenia, a doença de Chagas é dividida em duas fases: a aguda, que perdura de quatro a oito semanas; e a fase crônica, a qual persiste ao longo de toda a vida do paciente. A fase aguda, quando sintomática, caracteriza-se pela presença de um grande número de parasitas na corrente sanguínea (parasitemia) e em diversos tecidos (parasitismo tissular), infiltrados inflamatórios, ativação excessiva do sistema imune com altos níveis de citocinas, ativação intensa das células T e B, hepato, espleno e linfomegalia, febre prolongada, edemas subcutâneos e, em casos de transmissão vetorial, chagoma de inoculação, quando da entrada do *T. cruzi* pela pele, ou sinal de Romana, via mucosa ocular (Junqueira et al., 2010; Rassi et al., 2010). Cerca de 10% dos pacientes que desenvolvem sintomas durante a fase aguda da doença morrem em consequência de miocardite severa ou meningoencefalite, ou ambas (Rassi et al., 2010). Com o estabelecimento de uma resposta imune adaptativa efetiva e subsequente controle do parasita circulante e do parasitismo, cerca de 90% das manifestações clínicas apresentadas nessa fase são eliminadas, mesmo sem o tratamento com drogas antiparasitárias.

Cerca de 60-70% dos pacientes que entram na fase crônica da doença nunca apresentam quaisquer sinais clínicos aparentes da infecção, configurando, assim, a forma indeterminada crônica da doença. Os outros 30-40% dos pacientes restantes desenvolvem a forma determinada da doença, a qual pode ser cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. Em linhas gerais, a forma cardíaca da doença é caracterizada por miocardite intensa, resultante em cardiomegalia, arritmias e falência cardíaca (Junqueira et al., 2010), decorrentes da presença de infiltrados inflamatórios linfomonocitários que promovem destruição e fibrose do tecido cardíaco e dilatação das câmaras (Brenner e Andrade, 1987; Tanowitz et al., 1992; Kirchhoff, 1996). Já na forma digestiva, é comum a ocorrência de megaesôfago e megacólon, observando-se a presença de infiltrados linfocitários focais e denervação entérica (Junqueira et al., 2010; Lescure et al., 2010). A combinação de ambas as formas resulta na forma cardiodigestiva da doença.

Os quadros clínicos apresentados pelos pacientes na fase aguda ou crônica da doença de Chagas são altamente variáveis e dependentes de fatores relacionados tanto ao hospedeiro quanto ao parasita (Andrade, 1990; Higuchi et al., 1993; Vago, Macedo et al., 1996). De maneira similar, a patogenicidade observada em camundongos infectados com *T. cruzi* é altamente dependente da cepa (Andrade, 1990; Andrade et al., 1999; Vago et al., 2000), do

inóculo (Marinho et al., 1999) e de fatores genéticos intrínsecos à linhagem de camundongo utilizada (Trischmann et al., 1978; Marinho et al., 2004), que podem operar em forma independente do sistema imune, ou refletir a ação de diversos componentes do sistema imunológico (Hontebeyrie-Joskowicz e Minoprio, 1991; Brener e Gazzinelli, 1997; Michailowsky et al., 2001).

1.2 Reativação da doença de Chagas no sistema nervoso central

As primeiras evidências do comprometimento do sistema nervoso central (SNC) durante a infecção pelo *T. cruzi* datam da descoberta da doença, quando Carlos Chagas reportou, em crianças, condições intelectuais precárias, agitação e perturbações funcionais do sistema nervoso (Chagas, 1909). Poucos anos depois, Chagas relatou a incidência de meningoencefalite em pacientes jovens que desenvolviam a fase aguda da doença (Chagas, 1911).

Embora possa ocorrer um quadro de meningoencefalite durante a fase aguda da doença de Chagas e tripomastigotas possam ser encontrados no fluido cerebroespinal na ausência de anormalidades neurológicas (Hoff et al., 1978b), não existem, até o momento, evidências consistentes do desenvolvimento de uma forma neurológica crônica da doença em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, pode haver a reativação da doença no SNC de indivíduos chagásicos crônicos imunodeprimidos, em decorrência da co-infecção pelo HIV ou do uso de drogas imunossupressoras (Oddo et al., 1992; Rocha et al., 1994; Rassi et al., 2010). Nesse contexto, estudos relataram em tais indivíduos o aumento da parasitemia e da replicação do parasita intracelular, a presença do *T. cruzi* no fluido cérebro-espinal, a ocorrência de meningoencefalite, hipertensão intracranial, dores de cabeça, febre, status mental alterado, déficits neurológicos focais, chagoma cerebral com amastigotas, lesões cerebrais focais e difusas, dentre outros (Leiguarda et al., 1990; Rosemberg et al., 1992; Jardim e Takayanagui, 1994; Marchiori et al., 2007; Cordova et al., 2008; Diazgranados et al., 2009; Rassi et al., 2010). Além disso, autópsias de pacientes revelaram o desenvolvimento de encefalite multifocal com nódulos gliais ou microgliais, granulomas, necrose e hemorragia (Pittella, 1993; Rocha et al., 1994). Raramente são observados neurônios infectados, sendo os astrócitos e as microglias (macrófagos residentes do SNC) as células mais frequentemente parasitadas (Pittella, 1991; Rocha et al., 1994).

É importante ressaltar que embora um número crescente de estudos tenha relatado a ocorrência da infecção pelo *T. cruzi* no SNC de indivíduos imunodeprimidos, a reativação da doença de Chagas no SNC ainda é, em muitos casos, erroneamente diagnosticada como toxoplasmose cerebral (Lescure et al., 2010; Rachid et al., 2010), o que vem a agravar o risco de morte desses pacientes.

2 A Resposta Imune na Doença de Chagas

Na infecção humana ou experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, o estabelecimento de uma resposta imune específica, coincidente com o fim da fase aguda, impõe uma limitação severa à replicação e disseminação do parasita. Para que tal processo ocorra, é fundamental a combinação de mecanismos efetores desenvolvidos por ambas as respostas imunes inata e adaptativa. Logo que invade o tecido do hospedeiro, o parasita é reconhecido por macrófagos, células dendríticas e outras populações residentes, as quais produzem citocinas (TNF- α , IL-12) e quimiocinas (RANTES) pró-inflamatórias (Lescure et al., 2010). Receptores da imunidade inata, tais como os receptores do tipo Toll (TLRs) e do tipo Nod (NLRs) são extremamente importantes para o reconhecimento do *T. cruzi* (Tarleton, 2007; Junqueira et al., 2010). As células NK, sob estímulo local de citocinas pró-inflamatórias (IL-12), liberam IFN- γ (Cardillo et al., 1996; Sardinha et al., 2006; Lescure et al., 2010), o qual induz a produção de moléculas efetoras pelos fagócitos, dentre elas as espécies reativas de nitrogênio (RNS) e de oxigênio (ROS) e as GTPases. Ao passo que as RNS e as ROS causam danos ao DNA cinetoplástico e nuclear do parasita (Cabrera et al., 2011), as GTPases aceleram a formação dos fagolisossomos (Santiago et al., 2005), diminuindo, assim, a susceptibilidade ao *T. cruzi*. Concomitantemente, as células dendríticas migram aos órgãos linfóides secundários, onde estabelecem uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Assim, nos linfonodos e baço, as células dendríticas secretam IL-12 e apresentam, via moléculas do MHC, os antígenos do parasita às células T, estimulando a diferenciação e expansão clonal dos linfócitos T CD4⁺ (T auxiliares 1, TH1) e T CD8⁺ (T citotóxicos). Subsequentemente, os linfócitos efetores são recrutados para o tecido infectado, onde reconhecem as células que apresentam peptídeos do parasita via moléculas do MHC-I (aos T CD8⁺) ou do MHC-II (aos T CD4⁺) e, então, secretam níveis elevados de IFN- γ (Tarleton et al., 1994; Sardinha et al., 2006) e outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais potencializam o recrutamento de células monocitárias. Além do mais, os linfócitos T CD8⁺ destroem as células que contêm formas amastigotas do parasita. Nas células residentes e recrutadas, o

IFN- γ e o TNF α produzidos localmente reforçam diferentes mecanismos efetores frente ao *T. cruzi*, dentre eles a expressão da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), que determina a produção de óxido nítrico (Golden e Tarleton, 1991; Gazzinelli et al., 1992; Aliberti et al., 1999), o qual, como indicado acima, é um metabólito essencial no controle de algumas cepas do parasita (Petray et al., 1994; Vespa et al., 1994; Holscher et al., 1998; Saeftel et al., 2001; Cummings e Tarleton, 2004). Com relação à resposta humoral, os linfócitos B são induzidos pelos linfócitos T CD4⁺ a passarem por uma expansão clonal, diferenciação celular em plasmócitos (células secretoras de anticorpos) e à mudança isotípica de anticorpos (IgG2a em camundongos e IgG1 em humanos), sendo esse último processo dependente de IFN- γ . Durante a infecção pelo *T. cruzi*, os anticorpos têm papel fundamental no processo de remoção de tripomastigotas do sangue e dos tecidos pelos fagócitos (Rodriguez et al., 1981).

3 O comprometimento do sistema nervoso central de camundongos deficientes em IL-12 e IL23, infectados com *T. cruzi* da cepa SylvioX10/4

A IL-12 é uma citocina heterodimérica formada por duas cadeias, a IL-12p35 e a IL-12p40, sendo que a subunidade IL-12p40 também é comum à IL-23, na qual forma um heterodímero com a cadeia IL-23p19. O receptor para IL-12 também é formado por duas cadeias, a IL-12R β 1 e a IL-12R β 2, sendo que a cadeia IL-12R β 1 também faz parte da estrutura do receptor para IL-23, em conjunto à subunidade IL-23R. Ambas a IL-12 e a IL-23 são produzidas por células apresentadoras de antígeno (APCs) ativadas. (Oppmann et al., 2000; Bastos et al., 2004).

Como se sabe, a IL-12 é uma citocina fundamental na diferenciação das células T CD4⁺ naïve para o fenótipo funcional TH1, estimulando a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ assim como pelas células natural killer (NK). Uma vasta gama de estudos tem demonstrado a importância dessa citocina no controle da infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos geneticamente deficientes em IL-12 ou tratados com anticorpos nomoclonais neutralizantes de IL-12 apresentaram altos níveis de parasitemia, alta taxa de mortalidade (Abrahamsohn e Coffman, 1996; Aliberti et al., 1996; Michailowsky et al., 1998; Silva et al., 1998; Michailowsky et al., 2001) e elevado parasitismo cardíaco (Michailowsky et al., 2001). Por outro lado, a administração de IL-12 recombinante aos camundongos infectados foi capaz de lhes prolongar a sobrevivência e de promover uma redução dos níveis de parasitemia (Aliberti et al., 1996).

A IL-23 também é uma citocina pró-inflamatória, a qual atua na manutenção das células TH17 (Bettelli et al., 2006), uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺. Estudos emergentes têm sugerido a participação das células TH17, produtoras da citocina pró-inflamatória IL-17, em processos inflamatórios e doenças autoimunes (Damsker et al., 2010). Uma vez que receptor da IL-23 é capaz de desencadear uma série de sinais intracelulares, culminantes na fosforilação dos transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT) 1, 3, 4 e 5, não é de se surpreender que na ausência da IL-23, a produção de IFN- γ , a qual depende da fosforilação de STAT4, seja prejudicada (Oppmann et al., 2000; Tan et al., 2009). Como exemplo, um estudo realizado com camundongos deficientes em IL-12p40 (IL-12p40KO) reporta um déficit na eliminação do *Toxoplasma gondii* por esses animais, associado à queda na produção de IFN- γ (Lieberman et al., 2004). Interessantemente, a administração de IL-23 prolonga, porém não permite a sobrevivência dos animais IL-12p40KO infectados com *T. gondii*, sugerindo que a IL-23 compense parcialmente a falta da IL-12 (Lieberman et al., 2004). Até a presente data, o papel da IL-23 e da IL-17 na doença de Chagas permanece pouco compreendido. Estudos recentes demonstram que a IL-17 é necessária para a proteção do hospedeiro durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (Da Matta Guedes et al., 2010; Miyazaki et al., 2010). De acordo com os dados de Da Matta Guedes e colaboradores (Da Matta Guedes et al., 2010), a administração de anticorpos neutralizantes de IL-17 a camundongos infectados com *T. cruzi* resulta em queda na sobrevivência desses animais, acompanhada por intensa miocardite. Além disso, esses autores constataram que o bloqueio da IL-17 proporciona um aumento na produção de TNF- α , IL-12 e IFN- γ , responsáveis pelo grande influxo de células ao coração. Miyazaki e colaboradores (Miyazaki et al., 2010) também demonstraram aumento na taxa de mortalidade de camundongos deficientes em IL-17A infectados com *T. cruzi*, acompanhada por parasitemia elevada e falência múltipla dos órgãos. Entretanto, contrariamente ao estudo de Da Matta Guedes e colaboradores (Da Matta Guedes et al., 2010), Miyazaki *et al.* (Miyazaki et al., 2010) não constaram inflamação exacerbada no coração e nem produção elevada de TNF- α e IFN- γ na ausência de IL-17A, sugerindo que os danos causados pela infecção sejam decorrentes de ativação atenuada do sistema imune dos camundongos imunodeficientes.

O fato da doença de Chagas evoluir na maior parte dos indivíduos sem quaisquer manifestações clínicas de injúrias do SNC nos indica que, ora a colonização do SNC pelo *T. cruzi* é muito escassa, resultado de um baixo tropismo do protozoário pelo tecido nervoso, ou que os mecanismos de resistência local ao parasita no SNC são altamente eficientes.

Apoiando a última possibilidade, temos observado que camundongos IL-12p40KO, quando infectados pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio X10/4, apresentam sinais clínicos de danos do SNC, evidenciados por paralisia progressiva ascendente, da cauda aos membros anteriores. Destaca-se o fato dos animais IL-12p40-KO, assim como os animais imunocompetentes, não apresentam parasitemias patentes no decurso da infecção pelo parasita Sylvio X10/4 (Marinho et al., 2009), um clone de *T. cruzi* isolado por Miles (Miles, 1974) a partir de um inseto *Rhodnius prolixus*, utilizado no xenodiagnóstico de um paciente com infecção aguda, oriundo da região norte do Brasil (Silveira et al., 1979). Diferentemente dos animais IL-12p40KO, camundongos IFN- γ KO são extremamente susceptíveis à infecção por parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e morrem antes mesmo de apresentarem quaisquer sinais de danos neurológicos, com altos níveis de parasitemia e parasitismo cardíaco (Marinho et al., 2007). Contudo, o mesmo não se observa quanto aos camundongos deficientes em iNOS quando infectados por parasitas da cepa Sylvio X10/4. Assim, esses animais apresentam comportamento similar àquele dos camundongos imunocompetentes, isto é, alta sobrevida acompanhada de níveis baixos ou até mesmo inexistentes de parasitemia e de parasitismo cardíaco (Marinho et al., 2007).

II OBJETIVOS

Em função do exposto anteriormente e da pouca informação existente na literatura à respeito do controle do *Trypanosoma cruzi* no SNC, um local onde se podem desenvolver lesões importantes em crianças e pacientes imunossuprimidos, tomamos como modelo experimental de estudo da forma nervosa da doença de Chagas a infecção de camundongos IL-12p40KO por parasitas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. Acreditamos que o estudo aqui apresentado deverá permitir uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na reativação da doença de Chagas no SNC, observada em pacientes chagásicos crônicos com AIDS ou em pacientes transplantados submetidos à terapia imunossupressora. Sendo assim, pretendemos:

- a) Avaliar, detalhadamente, as disfunções motoras apresentadas pelos animais IL-12p40KO infectados com parasitas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*;
- b) Analisar a medula espinal em nível tissular, acerca do envolvimento dos neurônios, microglias/macrófagos e astrócitos, bem como da integridade da bainha de mielina e da presença de substâncias potencialmente neurodegenerativas frente à lesão desencadeada pelo *T. cruzi*;
- c) Avaliar a cinética de infecção do *T. cruzi* bem como da transcrição gênica de substâncias pró-inflamatórias na medula espinal de camundongos IL-12p40 deficientes e competentes;
- d) Estudar, *in vitro*, a interação microglia *versus* parasita, quanto à capacidade de fagocitose e destruição do parasita.

III CAPÍTULO I

Neurodegeneração e produção elevada de nitrotirosina, sintase de óxido nítrico, IFN- γ e S100 β na medula espinal de camundongos deficientes em IL-12p40, infectados com *Trypanosoma cruzi*¹

André Luis Bombeiro^{1,2}, Maria Regina D'Império Lima¹, Gerson Chadi² e José Maria Álvarez¹

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil;

² Centro de Neuroregeneração, Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo

A doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi* e ocorre na maioria dos países da América Latina. Em hospedeiros humanos imunocomprometidos, o protozoário pode colonizar o sistema nervoso central (SNC), causando desordens neurológicas. O controle sistêmico das formas intracelulares do parasita depende, amplamente, do estabelecimento de uma resposta TH1 e subsequente liberação de óxido nítrico. No SNC, sabe-se que baixas concentrações de óxido nítrico promovem a sobrevivência e o crescimento de neurônios, ao passo que concentrações mais elevadas exercem efeitos tóxicos e até mesmo a morte neuronal. O fator derivado da glia S100 β , abundantemente produzido em algumas doenças neurodegenerativas, também contribui com a produção de óxido nítrico. Em função do exposto, estudamos a expressão de óxido nítrico, interferon (IFN)- γ e S100 β na medula espinal de camundongos IL-12p40 Knockout (KO) infectados com *T. cruzi*. **Métodos:** camundongos fêmeas IL-12p40KO e selvagens (WT), infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 (10⁵ tripomastigotas, i.p.), foram submetidos à eutanásia quando os indivíduos IL-12p40KO apresentaram paralisia completa dos membros. Secções das medulas espinais foram

---

¹ O texto apresentado neste capítulo é uma reprodução do artigo “Neurodegeneration and increased production of nitrotyrosine, nitric oxide synthase, IFN- γ and S100 β protein in the spinal cord of IL-12p40-deficient mice infected with *Trypanosoma cruzi*”, publicado pelos autores acima creditados, no periódico Neuroimmunomodulation, 2010. 17(2): p. 67-78 (Veja ANEXO A). Pequenas adaptações no texto em função da tradução foram necessárias, contudo, não alteram o teor científico do trabalho. Além disso, seguindo-se as diretrizes de apresentação de tese desta Universidade, as referências encontram-se agrupadas em um único tópico, ao final deste volume.

submetidas aos procedimentos de imunoistoquímica para a visualização de neurofilamentos, laminina, nitrotirosina, sintase de óxido nítrico (NOS), IFN- γ e S100 β . O número total de neurônios foi estimado por análise estereológica e a área e a intensidade das imunomarcações foram estimadas por análise microdensitométrica/morfométrica de imagem. **Resultados:** nenhuma lesão foi encontrada na medula espinal de camundongos WT, ao passo que em vários níveis da medula espinal de camundongos IL-12p40KO foram vistos desarranjos morfológicos, muitos focos inflamatórios, vasos sanguíneos dilatados, ninhos de amastigotas e neurônios em processo de morte. Comparados aos camundongos WT, os camundongos IL-12p40KO apresentaram um decréscimo no número total de neurônios (46,4%; $p < 0,05$) e valores elevados de área de imunorreatividade para nitrotirosina (239%; $p < 0,01$) e NOS (544%; $p < 0,001$). Além disso, a intensidade das marcações para nitrotirosina (16%; $p < 0,01$), NOS (38%; $p < 0,05$) e S100 β (21%; $p < 0,001$) também se apresentaram elevadas. Nenhuma célula marcada para IFN- γ foi vista nas medulas espinais WT, contrariamente aos tecidos IL-12p40KO, que apresentaram células infiltrantes e também algumas células do parênquima positivamente marcadas para essa citocina. **Conclusão:** com base nesses resultados, sugerimos que a superprodução de óxido nítrico colabore com a morte de neurônios na medula espinal de camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi*, e que o IFN- γ e o S100 β contribuam com a ativação da NOS na ausência de IL-12.

1 Introdução

A infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* causa a doença de Chagas, um importante problema de saúde pública na América Latina, cujos danos mais evidentes apresentados pelos hospedeiros humanos na fase crônica da doença são a cardiomiopatia e as megassíndromes digestivas (Chagas, 1909; Leiguarda et al., 1990). A forma cerebral, mencionada por Carlos Chagas na descrição original da doença (Chagas, 1909), é uma complicação infrequente que ocorre durante a fase aguda. Entretanto, tem-se demonstrado que pacientes chagásicos crônicos podem sofrer reativação da doença no sistema nervoso central (SNC) quando imunodeprimidos, conforme observado em casos de co-infecção pelo HIV ou de tratamentos com drogas específicas que evitam a rejeição de transplantes. Nesses casos, pode-se constatar meningoencefalite com dores-de-cabeça, febre, déficits neurológicos, status mental alterado, coma e até mesmo morte (Leiguarda et al., 1990; Rosemberg et al., 1992; Rocha et al., 1994; Sartori et al., 2002; Sartori et al., 2002b; Marchiori et al., 2007). Contudo,

mesmo diante dessas complicações, poucos estudos têm focado o envolvimento do tecido nervoso na doença de Chagas, seja em humanos ou em modelos experimentais. Diversas estratégias são desenvolvidas pelo sistema imune para controlar a disseminação do *T. cruzi* durante a infecção, incluindo a secreção de citocinas, citotoxicidade celular e a produção de anticorpos específicos (Rodriguez et al., 1981; Russo et al., 1988; Araujo, 1989; Tarleton, 1990; Rottenberg et al., 1993; Rottenberg et al., 1995). A interleucina (IL)-12 tem-se demonstrado uma importante citocina nesse processo, pois estimula a produção de IFN- γ pelas células NK e T CD4⁺ (Aliberti et al., 1996; Silva et al., 1998). Em troca, o IFN- γ estimula os macrófagos a produzirem óxido nítrico, o qual é capaz de matar os parasitas intracelulares (Aliberti et al., 1999; Machado et al., 2000).

Aparte de seus efeitos antiparasitários, estudos têm demonstrado o papel duplo do óxido nítrico no tecido nervoso, que proveniente de diferentes fontes celulares, atua como um neurotransmissor e promove a sobrevivência e o crescimento neuronal quando presente em baixas concentrações (Dimmeler e Zeiher, 1999; Xiong et al., 1999). Contudo, em altas concentrações, ele pode exercer efeitos tóxicos levando os neurônios à morte (Bao e Liu, 2002; Shibata e Kobayashi, 2008). No tecido nervoso são encontradas as três isoformas conhecidas de óxido nítrico-sintase (NOS), ou seja, a forma neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS). Diferentemente das primeiras, a iNOS é ativada por mecanismos independentes de Ca²⁺ e produz grandes quantidades de óxido nítrico após o estímulo pelo IFN- γ (Xie e Nathan, 1993; Lovchik et al., 1995; De Oliveira et al., 1997; Michailowsky et al., 2001). Além disso, também se demonstrou que nos astrócitos a iNOS pode ser ativada pelo fator derivado da glia S100 β (Hu et al., 1996), independentemente de qualquer estímulo prévio por citocinas.

Poucos estudos têm relatado alterações comportamentais que remetam a processos de neurodegeneração em camundongos imunocomprometidos infectados com *T. cruzi* (Michailowsky et al., 2001; Marinho et al., 2007). Recentemente, demonstramos que camundongos IL-12p40 knockout (KO) infectados com parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* apresentam paralisia progressiva ascendente, da cauda aos membros anteriores (Marinho et al., 2007). Esses camundongos não expressam a subunidade p40 compartilhada pela IL-12 e pela IL23, sendo essa última, recentemente descrita (Oppmann et al., 2000), importante para a proliferação (Langrish et al., 2005) e manutenção das células inflamatórias TH17, uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). No presente trabalho, avaliamos a perda de neurônios e a presença de óxido nítrico, IFN- γ e S100 β na

medula espinal de camundongos selvagens (WT) e IL-12p40KO paralisados, ambos os grupos infectados com *T. cruzi*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais, parasitas e infecção

Camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes em IL-12/IL-23 (IL-12p40KO) com fundo genético C57BL/6, de oito a dez semanas de idade, foram alojados no Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos sob condições de total assepsia, em ciclos alternados de dia e noite (12 h cada), com temperatura e umidade controladas. A água e o alimento foram disponibilizados *ad libitum*, inclusive aos camundongos que apresentaram déficits neurológicos, sendo que nesses casos, os suprimentos foram colocados no chão da gaiola. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Ética em Experimentação Animal e os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Saúde Animal da Universidade de São Paulo.

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4 (Miles, 1974) foram obtidas a partir de infecções de células LLCMK2. Nove camundongos de cada grupo foram infectados i.p. com 10^5 parasitas e avaliados diariamente quanto às condições gerais e neurológicas. Além disso, as taxas de parasitemia foram avaliadas duas vezes por semana, por meio de exame microscópico de 5 μ L de sangue obtido da cauda, conforme descrito na literatura (Brener, 1962).

2.2 Eutanásia

Os camundongos IL-12p40KO que apresentaram paralisia completa dos membros (entre os dias 45 e 58 após a infecção) foram profundamente anestesiados com cetamina e xilasina (Vetbrands) e submetidos à eutanásia, via perfusão trans-cardíaca com 10 mL de solução salina isotônica em temperatura ambiente (TA), seguida de 50 mL de solução fixadora contendo paraformaldeído 4% (p/v, Merck, Alemanha) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1 M, pH6,9 (4°C, 6 min). Para cada animal knockout, um camundongo controle WT pareado, infectado e assintomático, também foi submetido à eutanásia conforme os procedimentos acima.

2.3 Preparo tecidual, seccionamento e amostragem

Após a perfusão, toda a medula espinal foi removida, pós-fixada em paraformaldeído 4% (4° C, 90 min) e então lavada em solução contendo 10% de sacarose (Merk, Alemanha) dissolvida em PBS 0,1 M, pH 7,4 (4° C, 48 h). As medulas foram reduzidas em três segmentos, relativos às regiões cervical, torácica e lombar. Após serem orientados ao longo do eixo rostrocaudal, os segmentos foram embebidos em meio de congelamento tecidual (Jung, Alemanha), congelados em isopentano (Sigma, USA) resfriado em gelo seco a -45° C e armazenados a -70° C até o uso.

Secções transversais adjacentes (14 µm de espessura) foram sistematicamente obtidas em um criostato (Leica, CM 3000, Alemanha) ao longo dos três segmentos, de tal modo que toda a medula espinal foi amostrada em nove pontos distintos (três pontos por segmento). Secções das medulas espinais de camundongos IL-12p40KO e WT pareados, obtidas da mesma altura, foram dispostas lado-a-lado nas lâminas e armazenadas a -70° C até o uso.

2.4 Procedimentos de imunoistoquímica para a localização de proteínas

Secções das medulas espinais de camundongos WT e IL-12p40KO foram lavadas 2x em PBS 0,1 M (TA, 10 min), incubadas em solução de leite desnatado 5% diluído em PBS 0,01 M (p/v; TA, 1 h), lavadas 2x em PBS 0,1 M (TA, 10 min), incubadas em solução de H₂O₂ 0,05% diluída em PBS 0,01 M (v/v, Sigma, USA; TA, 30min) para a aniquilação da peroxidase endógena. As secções foram novamente lavadas 2x em PBS 0,1 M (TA, 10 min) e, então, incubadas *overnight* (4° C) com um dos seguintes anticorpos espítopo-específicos: IgG de coelho anti-proteína S100β de vaca (Dako, USA), diluída 1:1.500; IgG de coelho anti-neurofilamento-200 (NF-200, Sigma, USA), diluída 1:600; IgG de coelho anti-laminina (Sigma), diluída 1:200; IgG de coelho anti-nitrotirosina (Sigma), diluída 1:500; IgG de coelho anti-sintase de óxido nítrico universal (uNOS, Sigma), diluída 1:100 e IgG monoclonal de rato botinilada, anti-IFN-γ de camundongo (BD Pharmingen, USA), diluída 1:50. Para a visualização dos parasitas foi utilizado um soro policlonal anti-*T. cruzi* Sylvio X10/4 (diluído 1:70), obtido de um rato cronicamente infectado. Previamente, o soro foi adsorvido em uma mistura de medula espinal e baço de camundongo para a remoção de anticorpos inespecíficos. Os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 0,5% Triton X-100 (Sigma, USA) e 1% soro albumina bovina (Sigma). Após duas lavagens em PBS 0,1M (TA, 10 min), as secções foram incubadas com anticorpos biotinilados de cabra anti-IgG de coelho (Vector, USA) ou anti-Ig de rato (Pharmingen), diluídos 1:250, conforme acima (TA, 1 h). As secções submetidas ao anticorpo biotinilado de rato anti-IFN-γ de camundongo não foram incubadas com o anticorpo

secundário. As secções foram lavadas 2x em PBS 0,1 M (TA, 10 min) e incubadas com avidina e peroxidase biotiniladas (Vector), ambas diluídas 1:125 (TA, 45 min) e, por fim, novamente lavadas 2x em PBS 0,1 M (TA, 10min) e 1x em tampão trisma 0,05 M (Sigma, USA) pH 7,4, (TA, 10 min). A imunorreatividade foi vista com o uso do cromógeno 3-3'-diaminobenzidina tetrahydrocloridro (DAB, 0,03%, w/v, Sigma, Alemanha) e H₂O₂ (0,05%, v/v, Sigma, Alemanha), ambos diluídos em trisma 0,05 M (TA). A reação foi interrompida em trisma 0,05 M quando os elementos mais escuros das secções estavam abaixo do ponto de saturação, o qual ocorreu, em geral, após 3min.

2.5 Análise estereológica

Secções da medula espinal de camundongos WT e IL-12p40KO (9 secções por medula, n=3 camundongos por grupo), imunomarcadas com NF-200 e contra-coradas com Giemsa, foram submetidas ao método de fracionamento óptico para a estimativa do número total de corpos neuronais em toda a medula espinal, indistintamente das substâncias branca ou cinzenta, incluindo-se os sítios de lesão. Cada 630ª secção foi sistematicamente amostrada ($f1=630$) e analisada usando-se um sistema “CAST” (Computer Assisted Stereological Toolbox), conforme descrito previamente (West e Gundersen, 1990; Andrade et al., 2008). Em suma, um microscópio motorizado com uma câmara de vídeo em cores foi interligado a um computador e a borda de toda a secção foi delineada. As coordenadas X e Y foram definidas (500µm ambas) e o *software* GRIDI criou uma série de campos uniformemente amostrados na secção. Sob aumento de 1000×, as células foram computadas (Q^-) em uma moldura de contagem de 2311µm² (a_{frame}), criada pelo *software*. Sabendo-se esses dados foi possível calcular a segunda fração de amostragem ($f2$): [(comprimento da coordenada X · comprimento da coordenada Y)/ a_{frame}]. Os movimentos na direção vertical (Z) foram monitorados com o auxílio de um equipamento denominado “microcator”, também interligado ao microscópio. O volume da amostragem (dissector) no eixo Z entendeu-se por 8µm de profundidade (altura do dissector), após exclusão das partes da secção próximas à lâmina e à lamínula. A espessura total da secção também foi medida, resultando em uma terceira fração de amostragem ($f3$): altura da secção/altura do dissector. Após a análise de todas as secções, a seguinte fórmula foi aplicada para a estimativa do número total de neurônios na medula espinal:

$$N_{total} = \Sigma Q^- \cdot f1 \cdot f2 \cdot f3.$$

2.6 *Análise semi-quantitativa de imagem por microdensitometria/morfometria*

Secções da medula espinal de camundongos WT e IL-12p40KO (9 secções por medula, n=3 camundongos por grupo) foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem (via o sistema de análise Kontron-Zeiss KS400), para a mensuração de imunorreatividade do S100 β , nitrotirosina, uNOS e IFN- γ . Os campos de amostragem (área = $44.1 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$) foram escolhidos de acordo com os critérios a seguir. Para os camundongos WT, os quais nunca apresentaram qualquer lesão na medula espinal, analisamos campos nos cornos anteriores e posteriores da substância cinzenta. Com relação aos camundongos IL-12p40KO, ao mensurar S100 β , nitrotirosina e uNOS escolhemos campos que margeavam as regiões de infiltrados inflamatórios. No caso do IFN- γ , escolhemos campos dentro dos sítios de inflamação, pois a maioria das células imunomarcadas encontrava-se ali. Na ausência de infiltrados inflamatórios, os campos foram amostrados nos cornos anteriores e posteriores. Os procedimentos foram descritos na literatura (Chadi et al., 1993; Chadi et al., 1993b; Chadi e Gomide, 2004; Silva et al., 2004). Em suma, uma câmara de vídeo adquiriu as imagens do microscópio (aumento de 400 $\times$) em tons de cinza e as transferiu a um computador. Os valores médios de tons de cinza (MGV) e a média do erro padrão foram medidos nos campos descritos acima e também em áreas da secção livres de marcação específica (*background*, bg). O MGV específico (spMGV) foi então definido como a diferença entre o MGV e o bgMGV dos perfis discriminados. O valor medido na lâmina de vidro, sem tecido, foi mantido constante a 200 MGV e o *background* foi mensurado em cada secção. O spMGV reflete a intensidade da imunorreatividade nos perfis discriminados e indica a quantidade de antígeno presente no campo analisado. Na avaliação morfométrica, foi medida toda a área imunorreativa discriminada, a qual inclui corpos e prolongamentos celulares (quando presentes e marcados). A área de imunorreatividade, por sua vez, é indicativa do estado de reação celular e da quantidade de células envolvidas em um evento específico.

2.7 *Análise estatística*

As comparações dos dados de estereologia e de imunorreatividade (área e intensidade de marcação) entre os grupos de camundongos IL-12p40KO e WT foram feitas por meio do teste-*t* não pareado, com o auxílio do *software* PRISM 4 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA).

3 Resultados

3.1 Lesões na medula espinal de camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi*

O clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* é uma cepa de baixa virulência que não causa parasitemia patente em camundongos WT (Postan et al., 1987; Marinho et al., 2007). Assim, ao longo do decurso experimental, obtivemos parasitemia nula tanto para os animais WT quanto para os IL-12p40KO. Os primeiros sinais de danos ao tecido nervoso tornaram-se aparentes aos 35 dias após a infecção, quando os camundongos IL-12p40KO, mas não os WT, começaram a desenvolver paralisia progressiva ascendente, a qual culminou na perda completa dos movimentos dos membros anteriores, seguida de morte. Visando a análise dos elementos envolvidos na disfunção motora, a medula espinal dos camundongos IL-12p40KO paralisados e seus controles WT, todos infectados com Sylvio X10/4, foram estudadas em nível tecidual. Nenhuma lesão foi observada na medula dos camundongos WT (Fig. 1A e B), ao passo que, ao longo de toda a medula dos animais IL-12p40KO, encontramos infiltrados massivos de células mono e polimorfonucleares, resultantes em danos morfológicos às substâncias branca e cinzenta (Fig. 1C). Adicionalmente, muitos vasos dilatados foram observados dentro das grandes lesões (Figura 1C, destaque), ao passo que poucos prolongamentos e somas neuronais remanescentes foram vistos entre as células infiltrantes (Fig. 1D). A análise estereológica demonstrou uma queda no número total de neurônios na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO (403.200 ± 93.980), em comparação aos WT (752.600 ± 75.150 ; $p < 0,05\%$). Além disso, formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram encontradas apenas nas medulas IL-12p40KO (Fig. 1E e F).

núcleos das células infiltrantes. E. Secção da medula espinal de um camundongo IL-12p40KO, demonstrando o parasitismo tecidual (castanho) ao longo de toda a área da lesão. Formas amastigotas de *T. cruzi* (F, esquerda, setas) e escassas formas tripomastigotas (F, direita, seta) foram vistas na medula espinal dos camundongos knockout. A-D. Tecido imunomarcado para NF-200, um filamento intermediário de neurônio, contra-corado com Giemsa, evidenciando neurônios (castanho) e núcleos celulares totais (azul), respectivamente. Os destaques em A e C mostram secções imunomarcadas para laminina, evidenciando os vasos. E e F. Tecido imunomarcado para proteínas de *T. cruzi* (castanho), contra-corado com Giemsa (azul). Escalas: A, C e E, 200 µm; A e C destaques, 100 µm; B e D, 20 µm; F, 10 µm.

Figura 1. Aspectos neurodegenerativos da medula espinal, induzidos pela infecção com *T. cruzi*.

Camundongos WT e IL-12p40KO foram infectados i.p. com 10^5 formas tripomastigotas do clone SylvioX10/4 de *T. cruzi* e sacrificados quando os indivíduos knockout apresentaram paralisia completa dos membros (45-58dpi). As medulas espinais (n=3, cada grupo) foram seccionadas e submetidas a procedimentos de imunohistoquímica. Secção representativa da medula espinal de camundongo WT infectado, demonstrando morfologia tecidual preservada (A), vasos intactos (A, destaque, setas) e neurônios saudáveis (B, setas). Secção representativa da medula espinal de camundongo IL-12p40KO infectado, mostrando o tecido morfologicamente corrompido (C), rico em focos inflamatórios (azul) e vasos dilatados (C, destaque, setas). D. Campo amplificado da figura C, demonstrando pequenos processos e somas neuronais remanescentes (setas) entre os

3.2 *Perfis de imunorreatividade*

Marcações imunorreativas para nitrotirosina foram vistas nos neurópilos e citoplasma dos neurônios ao longo das substâncias branca e cinzenta da medula espinal dos camundongos WT e IL-12p40KO (Fig. 2A e B). Contudo, apesar das similaridades, as imunomarcações eram mais intensas no tecido IL-12p40KO. Também, nas secções IL-12p40KO, as células infiltrantes e os vasos sanguíneos encontravam-se claramente marcados (Fig. 2B). De acordo com a análise semi-quantitativa de microdensitometria/morfometria de imagem, houve um aumento significativo na área de imunorreatividade para nitrotirosina na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO, em comparação aos WT (Fig. 3A e B; Tabela 1). Além disso, constatamos maior concentração de nitrotirosina na medulas IL-12p40KO, evidenciada pelos valores médios de tons de cinza específicos (Fig. 3C e D; Tabela 1).

somas neuronais, as pontas de seta indicam os vasos (claramente demarcados em B) e os asteriscos indicam as áreas de lesão. Escalas: A-H, 50 μm ; F destaque, 20 μm .

Figura 2. Perfis de Imunorreatividade. Microfotografias representativas da medula espinal dos camundongos WT (A, C, E, G) e IL-12p40KO (B, D, F, H), todos infectados com *T. cruzi*, demonstrando os perfis de imunoreatividade para nitrotirosina, para visualização indireta de óxido nítrico (A e B), para sintase de óxido nítrico, NOS (C e D), para IFN- γ (E e F) e para S100 β (G e H). Uma célula não leucocitária positivamente marcada para IFN- γ é mostrada em F (destaque). As setas indicam os

Tabela 1 - Porcentagem relativa ao aumento da área de imunorreatividade e à intensidade de marcação (spMGV) para os diferentes alvos, na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO em comparação aos WT, todos infectados com *T. cruzi*.

		Área	spMGV
Nitrotirosina	ME	239%, p<0,01	16%, p<0,01
	C	251%, p<0,05	23%, p<0,05
	T	146%, p<0,05	12%, p<0,01
	L	406%, p<0,01	15%, p<0,05
uNOS	ME	544%, p<0,001	38%, p<0,05
	C	432%, p<0,01	48%, NS
	T	387%, p<0,001	34%, p<0,05
	L	1,060%, p<0,05	33%, p<0,05
S100 β	ME	17%, NS	21%, p<0,001
	C	64%, NS	33%, p<0,05
	T	24%, NS	10%, NS
	L	15%, NS	18%, NS
ME: medula espinal total; C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar; NS: não significativo			

Figura 3. Área e intensidade de imunomarcção para nitrotirosina. Após os procedimentos de imunomarcção para nitrotirosina, para visualização indireta de óxido nítrico, nove secções de cada medula espinal dos camundongos WT (n=3) e IL-12p40KO (n=3), todos infectados, foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem para a mensuração da área e da intensidade dos perfis de imunorreatividade discriminados. A área de imunorreatividade em toda a medula espinal (A) bem como em seus segmentos (B) foi maior no grupo IL-12p40KO do que no grupo WT. Ademais, a intensidade da imunorreatividade (spMGV) no tecido IL-12p40KO também foi maior que no WT, para toda a medula espinal (C), bem como para os seus segmentos (D). Camundongo WT (□) e IL-12p40KO (■). C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar. Média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, de acordo com o teste-*t* não pareado.

Similarmente à nitrotirosina, os perfis de imunomarcção para uNOS foram visualizados ao longo de todas as regiões das substâncias branca e cinzenta da medula espinal dos camundongos WT e IL-12p40KO (Fig. 2C e D). Além do mais, a intensidade de marcação para uNOS também foi mais intensa no tecido IL-12p40KO, ainda que as células endoteliais vasculares não estivessem fortemente imunopositivas (Fig. 2D). De acordo com a análise microdensitométrica/morfométrica de imagem, confirmamos que a área e a intensidade (spMGV) dos perfis de marcação para uNOS na medula espinal dos animais IL-12p40KO estavam elevadas, em comparação aos camundongos WT (Fig. 4; Tabela 1).

Figura 4. Área e intensidade de imunomarcção para sintase de óxido nítrico universal (uNOS). Um anticorpo universal que se liga às três isoformas de NOS (neuronal, endotelial e induzível) foi utilizado. Nove secções de cada medula espinal dos camundongos WT (n=3) e IL-12p40KO (n=3), todos infectados, foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem para mensuração da área e da intensidade dos perfis de imunorreatividade discriminados. Comparada à medula WT, a medula espinal dos camundongos IL-12p40KO apresentou maior área de imunorreatividade para uNOS em sua totalidade (A), bem como em seus segmentos (B). Além disso, a intensidade de marcação (spMGV) apresentada pelo tecido IL-12p40KO foi maior que aquela do tecido WT, em sua totalidade (C) bem como nos segmentos torácico e lombar (D). Camundongo WT (□) e IL-12p40KO (■). C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar. Média $\pm$ erro padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, de acordo com o teste-t não pareado.

Nenhuma marcação para IFN- γ foi vista na medula dos camundongos WT (Fig. 2E). Entretanto, em relação ao grupo IL-12p40KO, observamos que os sítios de lesão encontravam-se predominantemente marcados para IFN- γ (Fig. 2F). Além disso, nas áreas preservadas que margeavam as lesões, também observamos algumas células não-esféricas positivamente marcadas (Fig. 2F, destaque). Na Figura 5, apresentamos os valores de área e de intensidade de marcação para IFN- γ nos sítios de lesão da medula espinal dos camundongos IL-12p40KO. Devido à ausência de IFN- γ nas secções WT, não foi possível proceder com as análises de imagem para esse grupo.

Figura 5. Área e intensidade de imunomarcção para IFN- γ . Nove secções de cada medula espinal dos camundongos WT (n=3) e IL-12p40KO (n=3), ambos os grupos infectados, foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem para mensuração da área e da intensidade dos perfis de imunorreatividade discriminados. Na medula espinal dos camundongos WT, nenhuma marcação para IFN- γ foi observada. Já em relação aos animais IL-12p40KO, foi possível mensurar a área de imunorreatividade em toda a medula (A) e em seus segmentos (B), além da intensidade de marcação (spMGV), em toda a medula espinal (C) e em seus segmentos (D). C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar.

Com relação ao S100 β , foram observadas células neuronais, gliais e endoteliais imunomarcadas ao longo das substâncias branca e cinzenta, em ambos os grupos de camundongos WT (Fig. 2G) e IL-12p40KO (Fig. 2H). Na medula espinal IL-12p40KO, observamos células da glia fortemente imunorreativas nas bordas das lesões, não sendo encontradas, entretanto, quaisquer células infiltrantes imunopositivas para S100 β (Fig. 2H). No que diz respeito à área de imunorreatividade, não observamos diferenças entre camundongos WT e IL-12p40KO (Fig. 6A e B; Tabela 1), porém, a intensidade da marcação foi maior em toda a medula espinal e na intumescência cervical dos camundongos IL-12p40KO, quando comparados aos WT (Fig. 6C e D; Tabela 1).

Figura 6. Área e intensidade de imunomarcção para S100- β . Nove secções de cada medula espinal dos camundongos WT (n=3) e IL-12p40KO (n=3), ambos os grupos infectados, foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem para mensuração da área e da intensidade dos perfis de imunorreatividade discriminados. A área imunorreativa para S100 β não se diferiu estatisticamente entre os grupos de camundongos WT e IL-12p40KO ao longo de toda a medula espinal (A) ou de seus segmentos (B). Entretanto, a intensidade da marcação (spMGV) foi maior na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO, em sua totalidade (C), bem como nas intumescências cervical e lombar (D), em comparação aos camundongos WT. Camundongo WT (□) e IL-12p40KO (■). C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar. Média $\pm$ erro padrão. *p<0,05; **p<0,01; de acordo com o teste-t não pareado.

4 Discussão

A incapacidade em desenvolver uma resposta imune eficiente por parte dos camundongos IL-12p40KO certamente favorece a entrada do *T. cruzi* na medula espinal e subsequente colonização do tecido nervoso. Assim como os macrófagos IL-12p40KO, os quais demonstram permissividade elevada aos parasitas Sylvio X10/4 de *T. cruzi* (Bastos et al., 2002), as microglias e outras populações celulares do SNC dos camundongos IL-12p40KO possivelmente falharam em conter localmente o crescimento dos parasitas intracelulares. Em vista disso, a persistência ou a reinvasão do protozoário pode ter originado um processo inflamatório crônico que, ao invés de conter a infecção local, intensificou o dano tecidual através da liberação de substâncias pró-inflamatórias e microbicidas que em elevadas

concentrações apresentam efeitos deletérios. Não obstante, observamos na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO chagásicos elevada imunorreatividade para a sintase de óxido nítrico e para a nitrotirosina, um metabólito gerado a partir da nitração de resíduos de tirosina pelo peroxinitrito. Um número crescente de estudos tem ressaltado o papel dúbio do óxido nítrico no SNC, especialmente por causa dos diferentes efeitos que exerce em baixas e altas concentrações, tais como a prevenção e a indução de apoptose por regulação das caspases, respectivamente (Kim et al., 2002). Visto que o óxido nítrico exerce um papel importante na eliminação do *T. cruzi* (Petray et al., 1995; Villalta et al., 1998), a superprodução dessa molécula em decorrência da infecção pelo parasita na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO pode ser vista como uma das causas do processo neurodegenerativo ali observado.

Como se sabe, o controle da disseminação do *T. cruzi* depende amplamente de uma resposta imune TH1 eficaz. Assim, durante os processos efetores, os fagócitos apresentadores de antígeno, engajados na comunicação bi-direcional com os linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ infiltrantes, liberam IL-12 em direção a essas células, as quais respondem produzindo IFN- γ . Por sua vez, o IFN- γ atua nos fagócitos, induzindo a iNOS a gerar grandes quantidades de óxido nítrico, o qual é um potente agente tripanosomicida (Aliberti et al., 1996; Silva et al., 1998; Michailowsky et al., 2001). Contudo, apesar da importância da IL-12 na produção de IFN- γ (Chan et al., 1991; Chan et al., 1992; Meyer Zum Buschenfelde et al., 1997), estudos relataram que mesmo os hospedeiros deficientes em IL-12 são capazes de produzir baixas quantidades de IFN- γ em diferentes circunstâncias (Muller et al., 2001; Barkhuizen et al., 2007; Way et al., 2007; Barkhuizen et al., 2008). Neste contexto, foi demonstrado que a produção de IFN- γ pelas células T em camundongos chagásicos deficientes em IL-12 é induzida pela IL-18 (Muller et al., 2001), além do fato de que a transcrição gênica elevada da IL-18 está co-relacionada com a produção de IFN- γ durante a infecção pelo *T. cruzi* (Meyer Zum Buschenfelde et al., 1997).

Ao relatarmos células imunomarcadas para IFN- γ na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO chagásicos, corroboramos nossos resultados anteriores (Marinho et al., 2007), em que os linfócitos T CD8⁺ e, em menor escala, os linfócitos T CD4⁺, todos isolados da medula espinal de camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi*, demonstraram-se capazes de produzir IFN- γ . Uma vez que a imunorreatividade ao IFN- γ ocorreu predominantemente nas áreas de lesão, supomos que essa citocina tenha contribuído com a produção de óxido nítrico via iNOS, pelas microglias ou macrófagos ativados.

No âmbito do sistema nervoso, o papel do IFN- γ tem sido objeto de vários estudos. Alguns trabalhos demonstraram a importância do IFN- γ como mediador da plasticidade neuronal, regulando a plasticidade sináptica (Vikman et al., 2001) e elevando a sinaptogênese (Brask et al., 2004) e a neurogênese (Wong et al., 2004), embora, contrariamente, o IFN- γ também possa inibir o crescimento de dendritos e a formação de sinapses (Kim et al., 2002). Afora os danos indiretos causados aos neurônios pelo IFN- γ , devido ao seu papel na liberação de óxido nítrico por macrófagos e microglias, Mizuno e colaboradores (Mizuno et al., 2008) demonstraram que essa citocina é capaz de induzir, diretamente, a neurodegeneração. Segundo esses autores, o IFN- γ liga-se aos complexos de receptores AMPA e evoca grande influxo de Ca^{2+} , o que acarreta a superativação da nNOS e, subsequentemente, a produção elevada de óxido nítrico.

Além da imunomarcagem para nitrotirosina nos sítios de lesão da medula espinal IL-12p40KO, também constatamos a presença desse metabólito em áreas periféricas à lesão. A livre difusão do óxido nítrico através das membranas (Bishop e Anderson, 2005) não explica, por si só, a forte imunorreatividade observada no tecido que margeia a lesão, haja visto que também observamos ali a presença de NOS. Tal fato nos sugeriu a participação dessa enzima na liberação de grande parte do óxido nítrico presente naquela área. Em vista disso, investigamos outros meios de ativação da NOS, independentemente das células do sistema imune. Nesse contexto, focamos na proteína glial S100 β , pois em altas concentrações ela estimula os astrócitos a produzirem óxido nítrico via iNOS (Hu et al., 1996) e, conseqüentemente, causa a morte neuronal com características de apoptose por meio de regulação parácrina (Hu et al., 1997). Como era de se esperar, nossos dados demonstraram imunorreatividade elevada para S100 β na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO, sugerindo a sua contribuição na liberação do óxido nítrico.

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento do óxido nítrico em desordens neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica (Good et al., 1998; Hyun et al., 2002; Tabner et al., 2002; Ischiropoulos e Beckman, 2003). Não obstante, Arantes e colegas (Arantes et al., 2004) relataram denervação intestinal intrínseca em camundongos infectados com *T. cruzi*, devido ao óxido nítrico induzido pelo IFN- γ . Em linha com esse trabalho, também foi relatada neurodegeneração *in vitro* decorrente ao óxido nítrico oriundo de macrófagos peritoneais infectados com *T. cruzi* e estimulados com IFN- γ (Almeida-Leite et al., 2007). Assim, sugerimos que as células infiltrantes e as células residentes da glia, uma vez estimuladas pelo IFN- γ e pelo S100 β ,

sejam capazes de produzir grandes quantidades de óxido nítrico, o qual contribui para o processo neurodegenerativo observado nas medulas espinais dos camundongos IL-12p40KO infectados pelo *T. cruzi*.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Dra. Sanae Kasahara pelo auxílio na aquisição das imagens, ao Rogério Silva do Nascimento e à Thereza Florence Dinucci pelo suporte técnico. Apoio financeiro provido pela FAPESP (06/50054-6; 06/53116-2; 07/00491-3) e pelo CNPq (303706/2007-4; 470390/2007-6).

IV. CAPÍTULO II

Disfunção do comportamento motor, morte neuronal e ativação glial em camundongos deficientes em IL-12p40 infectados com *Trypanosoma cruzi*

André Luis Bombeiro ^{1,2}, Claudio Romero Farias Marinho ³, Maria Regina D'Império Lima ¹,
Gerson Chadi ² e José Maria Álvarez ¹

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

² Centro de Neurodegeneração, Departamento de Neurologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

³ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo

A doença de Chagas é uma protozoose causada pelo *Trypanosoma cruzi* e é endêmica da América Latina. Desordens neurológicas decorrentes da infecção pelo *T. cruzi* têm sido descritas em crianças e em hospedeiros imunossuprimidos, contudo, pouco se sabe a respeito delas. No presente trabalho, analisamos o comportamento motor e o comprometimento da medula espinal de camundongos inumocompetentes (wild-type, WT) e deficientes em IL-12p40 (IL-12p40 knockout, KO) infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4. Ao contrário dos camundongos WT, os indivíduos IL-12p40KO desenvolveram uma paralisia ascendente, da cauda aos membros anteriores. Tal fato foi evidenciado pela atividade motora espontânea, pelo teste do plano inclinado e pela análise computadorizada de movimentos por sensores de raios infravermelhos. A análise estereológica da medula espinal dos camundongos IL-12p40KO paralisados revelou queda de 60% ($p < 0,05$) na densidade neuronal, acompanhada por um aumento de 780,6% ($p < 0,01$) na densidade de macrófagos/microglias, dos quais 36,3% ($p < 0,01$) estavam infectados. A análise morfométrica/microdensitométrica de imagem da medula knockout demonstrou um aumento na área de imunorreatividade ao marcador astrocitário GFAP (317,0%; $p < 0,01$) e ao glutamato (153%; $p < 0,05$). Adicionalmente, constatamos desmielinização nas áreas de lesão da medula IL-12p40KO, coincidente com a presença de nitrotirosina. De acordo com os dados de RT-PCR em tempo real, houve um aumento da expressão de mRNA para MIP-1 α , MCP-1, TNF- α , IFN- γ e iNOS ($p < 0,05$ para

todos), porém não para IL-17, na medula espinal do grupo knockout. Em vista desses resultados, sugerimos que na ausência de IL-12 e IL-23, o *T. cruzi* dissemine-se facilmente pela medula espinal. Consequentemente, macrófagos/microglias e astrócitos tornam-se reativos em um esforço de conter a infecção. Entretanto, a falta de uma resposta imune eficaz e a persistência do protozoário favorece a liberação contínua de substâncias que, acumuladas, tornam-se neurotóxicas, tais como o óxido nítrico e o glutamato. Finalmente, a disfunção motora é estabelecida como consequência do processo neurodegenerativo.

Sinopse

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, uma protozoose latino-americana conhecida por causar cardiomiopatia e megassíndromes digestivas. Além disso, ocorrer reativação da doença no sistema nervoso central (SNC) de hospedeiros imunossuprimidos, como aqueles infectados pelo HIV ou receptores de órgãos transplantados, causando meningoencefalite, lesões teciduais e até mesmo a morte. Embora os casos de envolvimento do SNC de pacientes chagásicos tenham aumentado nas décadas mais recentes, grande parte do nosso conhecimento restringe-se aos dados de biópsias e sintomas clínicos. Para melhor compreendermos o que ocorre no SNC durante a infecção pelo *T. cruzi*, estudamos camundongos imunossuprimidos chagásicos com deficiência na síntese da interleucina (IL-) 12, que atua na ativação de mecanismos microbicidas, e da IL-23, a qual é importante para a manutenção de uma população de células inflamatórias. Observamos uma paralisia ascendente, indicativa do comprometimento do tecido nervoso. Nas medulas espinais, confirmamos a presença do protozoário, infectando principalmente as microglias, consideradas células de defesa do SNC. Além disso, uma profunda inflamação foi desencadeada, acompanhada pela liberação de substâncias potencialmente neurotóxicas e desmielinizantes. Ademais, a morte de neurônios foi constatada, possivelmente causando os danos motores. Em vista do exposto, consideramos que esses novos dados sejam relevantes para o embasamento de estudos futuros que tenham por objetivo a compreensão dos mecanismos envolvidos na forma nervosa da doença de Chagas.

1 Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da doença de Chagas, uma protozoose endêmica na maioria dos países latino-americanos, na qual a cardiomiopatia e as megassíndromes digestivas são as desordens mais comumente apresentadas pelo hospedeiro humano na forma crônica da doença (Marinho et al., 2007). Embora o *T. cruzi* possa ser encontrado no fluido cérebro-espinhal no início da infecção (Hoff et al., 1978a), ele parece não causar danos ao sistema nervoso central (SNC), exceto quando o paciente encontra-se imunossuprimido. Assim, nos casos de co-infecção pelo HIV ou do uso de drogas imunossupressoras que evitam a rejeição de transplantes, o paciente chagásico pode sofrer reativação da doença no SNC, desenvolvendo meningoencefalite, hipertensão intracranial, déficits neurológicos, lesões focais, dentre outros (Rocha et al., 1994; Marchiori et al., 2007).

Embora tenha sido relatada a presença de ninhos do parasita e de infiltrados leucocitários no cérebro de camundongos imunocompetentes (Michailowsky et al., 2001), tal processo é notavelmente intensificado em camundongos deficientes em IL-12p40 (IL-12p40KO) e em IFN- γ , os quais podem desenvolver fortes distúrbios neurológicos (Michailowsky et al., 2001; Marinho et al., 2007; Bombeiro et al., 2010). Recentemente, reportamos que camundongos IL-12p40KO infectados com parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* apresentam paralisia progressiva ascendente, da cauda aos membros anteriores (Marinho et al., 2007; Bombeiro et al., 2010). Esses camundongos não sintetizam IL-12 e nem IL-23, pois a subunidade IL-12p40 compartilhada por ambas as interleucinas está ausente. A falta de IL-12 culmina em uma resposta imune TH1 prejudicada, visto que essa citocina induz a produção de IFN- γ pelas células T e NK, o qual, por sua vez, estimula os macrófagos a liberarem óxido nítrico, um potente agente tripanosomicida (Aliberti et al., 1996; Aliberti et al., 1999; Machado et al., 2000). Ademais, a falta de IL-23 também pode agravar os déficits imunológicos apresentados pelos camundongos IL-12p40KO, uma vez que ela estimula a produção de baixos níveis de IFN- γ pelas células T de memória humanas (Oppmann et al., 2000) e atua na manutenção das células inflamatórias TH17 (Veldhoen et al., 2006).

Durante a maioria dos processos degenerativos do SNC, as células da glia liberam mediadores pró-inflamatórios, radicais livres e proteases para limitar a lesão e restabelecer a homeostase tecidual (Aloisi, 2001; Dong e Benveniste, 2001). Entretanto, nos casos de persistência do estímulo inflamatório, essas substâncias são acumuladas no microambiente, agravando a injúria tecidual e a morte dos neurônios (Hendriks et al., 2005; Brown, 2007).

Além disso, fatores intrínsecos do SNC também auxiliam no processo de neurodegeneração quando presentes em altas concentrações, como o neurotransmissor glutamato. O aumento na liberação do glutamato ou a diminuição na reabsorção dele nas fendas sinápticas ocasiona o estímulo excessivo de seus receptores. Consequentemente, há um aumento no influxo de íons de cálcio, com o desencadeamento de sinais de morte e ativação de enzimas catabólicas (Foran e Trotti, 2009).

Uma vez que os danos motores e a resposta da glia frente à infecção pelo *T. cruzi* não estão bem caracterizados, realizamos um estudo detalhado das disfunções motoras manifestadas pelos camundongos IL-12p40KO infectados com parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e analisamos a medula espinal em nível tecidual, focando na inflamação e no envolvimento dos neurônios, macrófagos/microglias e astrócitos nas lesões decorrentes da infecção pelo protozoário.

2 Materiais e Métodos

2.1 Camundongos, parasitas e infecção

Camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes em IL-12/IL-23 (IL-12p40KO) com fundo genético C57BL/6, de oito a dez semanas de idade, foram alojados no Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos sob condições de total assepsia, em ciclos alternados de dia e noite (12 h cada), com temperatura e umidade controladas. A água e o alimento foram disponibilizados *ad libitum*, inclusive aos camundongos que apresentaram déficits neurológicos, sendo que nesses casos, os suprimentos foram colocados no chão da gaiola. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Ética em Experimentação Animal vigente e os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Saúde Animal da Universidade de São Paulo.

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* do clone Sylvio X10/4 (Miles, 1974) foram obtidas a partir de infecções de células LLCMK2. Camundongos WT e IL-12p40KO foram infectados i.p. com 10^5 parasitas e observados diariamente quanto às condições gerais e neurológicas. Além disso, as taxas de parasitemia foram avaliadas duas vezes por semana, por meio de exame microscópico de 5µL de sangue obtido da cauda, conforme descrito na literatura (Brener, 1962).

2.2 Avaliação comportamental

Os camundongos foram pesados e submetidos à avaliação comportamental três vezes por semana, até começarem a apresentar sinais de paralisia, a partir de quando passaram a ser monitorados quase que diariamente. Três análises comportamentais foram empregadas: (a) para a avaliação da atividade motora espontânea, o camundongo foi colocado em um campo aberto e analisado visualmente quanto aos movimentos espontâneos. Para tal, foi desenvolvida uma escala clínica baseada em Becher *et al.* (Becher et al., 2002) (Tabela 1); (b) o teste do plano inclinado, baseado em Rivlin e Tator (Rivlin e Tator, 1977), foi aplicado para a avaliação da função motora. O camundongo foi colocado em um plano emborrachado, com o seu corpo posicionado paralelamente ao eixo longitudinal do plano e com a cabeça voltada para baixo. Então, o plano foi inclinado e observado o grau correspondente ao ângulo máximo em que o animal pôde manter sua posição por 5 segundos sem cair. É importante ressaltar que camundongos saudáveis se mantêm no plano a uma amplitude que varia de 50 a 60 graus; (c) o registro automático da atividade motora, baseado no tempo de movimento (Andrade et al.), sem qualquer intervenção do observador, foi obtido usando-se um sistema de sensores de movimentos por raios infravermelhos (Coulbourn Instruments). Nele, cada camundongo é individualmente acomodado em uma caixa de polietileno (37x17x30 cm³) equipada com um sensor de movimentos e monitorado por 30min. Os dados obtidos correspondem ao número de eventos e ao tempo total em que o animal permanece parado ou se move por um período de até 0,01 s (número e tempo de paradas), ou durante o qual o animal se move constantemente por um período de até 0.1 s (número e tempo de pequenos movimentos) ou por um período igual ou superior a 1,0 s (número e tempo de grandes movimentos).

Tabela 1. Escala de danos motores, baseada na atividade motora espontânea *

Pontos	Sinais
0	Nenhum sinal detectável de paralisia
1	Perda do tônus muscular na região distal da cauda
2	Perda do tônus muscular na região proximal da cauda
3	Claudicação de um membro posterior (porção distal)
4	Paralisia proximal e/ou distal de um membro posterior ou paralisia distal de ambos os membros posteriores
5	Paralisia bilateral distal e proximal de ambos os membros posteriores
6	Alteração na coluna (cifose visível)
7	Paralisia proximal e/ou distal de um membro anterior ou paralisia distal de ambos os membros anteriores
8	Paralisia bilateral distal e proximal de ambos os membros anteriores

* Modificado de Becher *et al.* (Becher et al., 2002)

2.3 Preparo tecidual, seccionamento e amostragem

Camundongos IL-12p40KO completamente paralisados foram submetidos à eutanásia com cetamina e xilasina (Vetbrands, Brasil), seguida de perfusão trans-cardíaca com 10 mL de solução salina isotônica (NaCl 0,9% em água destilada) em temperatura ambiente (TA) e 50 mL de uma solução fixadora contendo 4% de paraformaldeído (p/v, Merck) em tampão fosfato (PBS) 0.1 M, pH 6.9 (4° C, 6 min). Para cada camundongo knockout, um camundongo WT foi submetido aos mesmos procedimentos acima. Após a perfusão, a medula espinal foi completamente removida, pós-fixada em paraformaldeído 4% (4° C, 90 min) e lavada em solução de sacarose 10% (Merk) dissolvida em PBS 0,1 M, pH 7,4 (4° C, 48 h). As medulas foram reduzidas em três segmentos (regiões cervical, torácica e lombar), os quais foram orientados ao longo do eixo rostrocaudal, embebidos em meio de congelamento tecidual (Jung) e congelados em isopentano (Sigma) resfriado em gelo seco a -45° C. Todas as amostras foram armazenadas a -70° C até o uso. Secções transversais adjacentes (14 µm de espessura) foram sistematicamente obtidas em um criostato (Leica, CM 3000) ao longo dos três segmentos, de tal modo que toda a medula foi amostrada em nove pontos distintos (três pontos por segmento). Secções das medulas espinais de camundongos IL-12p40KO e WT pareados, obtidas da mesma altura, foram dispostas lado-a-lado nas lâminas e armazenadas a -70°C até o uso.

2.4 Procedimentos de imunoistoquímica

a) Imunorreatividade de uma cor, para a detecção de um único antígeno. As lâminas histológicas foram lavadas 2x em PBS 0,1 M, pH 7.4 (TA, 10 min), incubadas em solução de leite desnatado 5% diluído em PBS 0,01 M (p/v; TA, 1 h), lavadas 2x em PBS 0,1M (TA, 10 min), incubadas em solução de H₂O₂ 0,05% diluída em PBS 0,01 M (v/v, Sigma, Brasil; TA, 30 min) para a aniquilação da peroxidase endógena. As secções foram novamente lavadas 2x em PBS 0,1 M (TA, 10 min) e, então, incubadas *overnight* (4° C) com um dos seguintes anticorpos espítopo-específicos, diluídos em PBS contendo 0,5% Triton X-100 (Sigma) e 1% soro albumina bovina (Sigma, USA): IgG de coelho anti-neurofilamento-200 (NF-200, Sigma), diluída 1:600; IgG de coelho anti-proteína acídica fibrilar da glia (GFAP, Dako), diluída 1:1.200; IgG de coelho anti-nitrotirosina (Sigma), diluída 1:500; IgG de coelho anti-glutamato (Sigma), diluída 1:1.000 e IgG de rato biotinilada anti CD11b de camundongo (BD Pharmingen), diluída 1:600. Após duas lavagens em PBS 0,1 M (TA, 10 min), as secções foram incubadas com anticorpo biotinilado de cabra anti-IgG de coelho (Vector), diluído 1:250 (TA, 1 h), conforme descrito acima. As secções foram lavadas 2x em PBS 0,1 M (TA, 10 min) e incubadas com avidina e peroxidase biotiniladas (Vector), ambas diluídas 1:125 (TA, 45 min) e, por fim, novamente lavadas 2x em PBS 0,1M (TA, 10 min) e 1x em tampão trisma 0,05 M (Sigma) pH 7,4 (TA, 10 min). A imunorreatividade foi vista com o uso do cromógeno 3-3'-diaminobenzidina tetrahidrocloridro (DAB, 0,03%, w/v, Sigma) e H₂O₂ (0,05%, v/v, Sigma), ambos diluídos em trisma 0,05 M (TA). A reação foi interrompida em trisma 0,05 M quando os elementos mais escuros das secções estavam abaixo do ponto de saturação, o qual ocorreu, em geral, após 3min.

b) Imunorreatividade de duas cores, para a detecção simultânea de *T. cruzi*/NF200, *T. cruzi*/GFAP, *T. cruzi*/CD11b, proteína básica de mielina (MBP)/NF200 e MBP/nitrotirosina. Após os procedimentos convencionais de imunoistoquímica de uma cor para a detecção de NF-200, GFAP, nitrotirosina e CD11b, descritos acima, as secções foram lavadas 3x em PBS 0,1 M, pH 7.4 (TA, 10 min) e incubadas em solução de H₂O₂ 5% diluída em PBS 0,01M (v/v, Sigma, TA, 30 min) para a aniquilação da peroxidase biotinilada. As secções foram novamente lavadas 4x em PBS 0,1 M (TA, 10 min) e incubadas com soro policlonal de rato anti-*T. cruzi* Sylvio X10/4, diluído 1:70, ou com anticorpo de coelho anti-MBP (DAKO, USA), diluído 1:100 (4° C, 96 h). O soro anti-*T. cruzi*, obtido de um rato cronicamente infectado, foi adsorvido em uma mistura de medula espinal e baço de camundongo para a remoção de anticorpos inespecíficos. O soro anti-*T. cruzi* e o anticorpo anti-MBP foram diluídos conforme descrito anteriormente, e a diluição e os procedimentos de incubação para

o anticorpo secundário [imunoglobulina de cabra biotilada anti-Igs de rato (BD Pharmingen), ou imunoglobulina de cabra biotilada anti- IgG de coelho (Vector)] e para o complexo de avidina e peroxidase biotilada foram os mesmos da imunoperoxidase de uma cor. A imunorreatividade foi vista com o uso do cromógeno 4-cloro-naftol (0,05%; p/v; Sigma) e H₂O₂ (0,03%, v/v, Sigma), ambos diluídos em trisma 0,05 M, pH 7,6 (TA). A reação foi interrompida em trisma 0,05 M após decorridos 10 min.

2.5 *Análise semi-quantitativa de imagem por microdensitometria/morfometria*

Secções da medula espinal de camundongos WT e IL-12p40KO (9 secções por medula, n=3 camundongos por grupo) foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem (via o sistema de análise Kontron-Zeiss KS400), para a mensuração de imunorreatividade ao GFAP e ao glutamato. Os campos de amostragem (área = $44,1 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$) foram escolhidos de acordo com os critérios descritos a seguir. Para os camundongos WT, os quais não apresentaram qualquer lesão na medula espinal, analisamos campos nos cornos anteriores e posteriores da substância cinzenta. Com relação aos camundongos IL-12p40KO, ao mensurar S100 β , nitrotirosina e uNOS escolhemos campos que margeavam as regiões de infiltrados inflamatórios. No caso do IFN- γ , escolhemos campos dentro dos sítios de inflamação, pois a maioria das células imunomarcadas encontrava-se ali. Na ausência de infiltrados inflamatórios, os campos foram amostrados nos cornos anteriores e posteriores. Os procedimentos descritos na literatura (Chadi et al., 1993; Chadi et al., 1993b; Chadi e Gomide, 2004; Silva et al., 2004) encontram-se resumidos a seguir. Uma câmara de vídeo adquiriu as imagens do microscópio (aumento de 400 $\times$) em tons de cinza e as transferiu a um computador. Os valores médios de tons de cinza (MGV) e a média do erro padrão foram medidos nos campos descritos acima e também em áreas da secção livres de marcação específica (*background*, bg). O MGV específico (spMGV) foi então definido como a diferença entre o MGV e o bgMGV dos perfis discriminados. O valor medido na lâmina de vidro, sem tecido, foi mantido constante a 200 MGV e o *background* foi mensurado em cada secção. O spMGV reflete a intensidade da imunorreatividade nos perfis discriminados e indica a quantidade de antígeno presente no campo analisado. Na avaliação morfométrica, foi medida toda a área imunorreativa discriminada, a qual inclui corpos e prolongamentos celulares (quando presentes e marcados). A área de imunorreatividade, por sua vez, indica o estado de reação celular e da quantidade de células envolvidas em um evento específico.

2.6 Análise estereológica

Secções da medula espinal de camundongos WT e IL-12p40KO (9 secções por medula, n=3 camundongos por grupo), imunomarcadas com NF-200 (neurônios) ou CD11b (macrófagos/microglias) e contra-coradas com Giemsa (núcleos celulares), foram submetidas ao método de fracionamento óptico para a estimativa do número total de células em toda a medula espinal, indistintamente das substâncias branca ou cinzenta, incluindo-se os sítios de lesão. No caso dos macrófagos/microglias, realizamos duas análises independentes para a obtenção do número de células infectadas e não infectadas, sendo que a soma de ambos corresponde ao número de células totais. Ressaltamos que todas as células polimorfonucleares imunomarcadas para CD11b foram descartadas dessa análise. Cada 210ª secção foi sistematicamente amostrada ($f1=210$) e analisada usando-se um sistema “CAST” (Computer Assisted Stereological Toolbox), conforme previamente descrito (West e Gundersen, 1990) e resumido a seguir. Um microscópio motorizado com uma câmara de vídeo em cores foi interligado a um computador e a borda de toda a secção foi delineada. As coordenadas X e Y foram definidas (500µm ambas) e o *software* GRIDI criou uma série de campos uniformemente amostrados na secção. Sob aumento de 1000×, as células foram computadas (Q^-) em uma moldura de contagem de 2311µm² (a_{frame}), criada pelo *software*. Sabendo-se esses dados foi possível calcular a segunda fração de amostragem ($f2$): [(comprimento da coordenada X · comprimento da coordenada Y)/ a_{frame}]. Os movimentos na direção vertical (Z) foram monitorados com o auxílio de um equipamento denominado microcator, também interligado ao microscópio. O volume da amostragem (dissector) no eixo Z entendeu-se por 8µm de profundidade (altura do dissector), após exclusão das partes da secção próximas à lâmina e à lamínula. A espessura total da secção também foi medida, resultando em uma terceira fração de amostragem ($f3$): altura da secção/altura do dissector. Após a análise de todas as secções, a seguinte fórmula foi aplicada para a estimativa do número total de neurônios na medula espinal:

$$N_{total} = \Sigma Q^- \cdot f1 \cdot f2 \cdot f3$$

O coeficiente de erro para esse procedimento foi obtido conforme já descrito na literatura (Gundersen et al., 1988). O volume total da medula espinal foi determinado pela soma dos valores resultantes da multiplicação das áreas das secções delineadas pela distância entre elas.

2.7 Quantificação relativa de mRNA via RT-PCR em tempo real

De um grupo adicional de camundongos chagásicos IL-12p40KO paralisados e WT, bem como de camundongos WT não infectados, obtivemos a medula espinal. Após perfusão com salina, conforme descrito anteriormente, a intumescência lombar foi imediatamente congelada em gelo seco e mantida em nitrogênio líquido. O RNA total foi isolado do tecido utilizando-se fenol ácido (TriZol, Invitrogen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e a concentração de RNA de cada amostra foi estimada com o uso de um kit de quantificação de RNA por fluorescência (Quant-it, Invitrogen, USA). As amostras foram incubadas com DNase para a digestão de DNA contaminante e a transcrição reversa foi realizada a partir de 2 µg de RNA total, utilizando-se primers aleatórios, tampão de reação, DTT, DNTP e SS-II RT (Invitrogen, Alemanha). A amplificação se deu por meio do sistema de PCR em tempo real Mx3005P (Stratagene, USA), com o uso do reagente SYBR Green e dos primers para TNF- α , IFN- γ , iNOS, IL-17 e GAPDH (para as seqüências, veja Giuletta et al., (Giuletta et al., 2001)). Quanto ao MCP-1 (CCL2) e ao MIP-1 α (CCL3), a amplificação foi realizada com o sistema ABI Prism 7900HT (ABI, Portugal), usando-se os ensaios de expressão gênica TaqMan da ABI (Mm00441242_m1 para MCP-1 e Mm00441258_m1, para MIP-1 α) e o reagente “TaqMan Universal PCR master mix”. As reações de amplificação foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes de ambos os sistemas de PCR em tempo real. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os níveis de mRNA obtidos foram normalizados em função de um gene endógeno de referência (β -actina para MCP-1 e MIP-1 α ou GAPDH para todos os outros) e, então, relativizadas à amostra controle (camundongo WT não infectado) aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores obtidos para a produção de mRNA foram expressos como a diferença, em número de vezes, em relação ao controle.

2.8 Análise estatística

Para a análise dos dados de RT-PCR em tempo real, de microdensitometria/morfometria de imagem e de estereologia, aplicamos o teste-*t* não pareado. Para a avaliação clínica, empregamos a análise de variância (ANOVA) de duas vias. Todos os dados foram analisados no programa PRISM 4 (Graph-Pad Software).

3 Resultados

3.1 Condições gerais e avaliação comportamental

O clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* é uma cepa de baixa virulência que não causa parasitemia patente em camundongos WT (Postan et al., 1987; Marinho et al., 2007). Não obstante, nossa análise indicou ausência de parasitemia nos animais WT e IL-12p40KO ao longo do decurso experimental.

Apoiados em nossas observações anteriores de déficits na atividade motora espontânea dos camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi* (Marinho et al., 2007; Bombeiro et al., 2010), desenvolvemos, com base em Becher e colegas (Becher et al., 2002), uma escala de avaliação clínica que compreende os sinais mais evidentes da disfunção motora (Tabela 1). Conforme esperado, apenas os camundongos IL-12p40KO apresentaram danos motores, sendo que a paralisia progrediu de forma ascendente, primeiramente afetando os movimentos das regiões distais da cauda, seguida de perda de movimento em toda a cauda, nos membros posteriores, na espinha e, finalmente, nos membros anteriores. Jamais observamos a reversão desse processo. Embora incomum, alguns camundongos manifestaram paralisia distal dos membros posteriores ao mesmo tempo em que mantiveram os movimentos da cauda. Entretanto, conforme a paralisia progredia, esses animais perdiam os movimentos da cauda. Por meio de inspeção visual da atividade motora, não foi observado qualquer sinal de paralisia nos camundongos WT (Fig. 1A), ao contrário dos camundongos IL-12p40KO, que começaram a apresentar as primeiras manifestações clínicas de disfunção motora ao 32º dia após a infecção (Fig. 1A). A submissão dos animais ao plano inclinado nos forneceu dados complementares àqueles obtidos da atividade motora espontânea. Os camundongos WT conseguiram permanecer no plano sob uma inclinação de 50-60 graus, ao passo que os indivíduos IL-12p40KO não foram capazes de alcançar tais valores a partir do dia 33 após a infecção (Fig. 1B). De acordo com o registro automático da atividade motora, ambas as linhagens se comportaram de modo diferente quanto ao número e à duração das paradas (Fig. 2A e B) e ao número e à duração dos grandes movimentos (Fig. 2E e F), porém, não quanto ao número e à duração dos pequenos movimentos (Fig. 2C e D).

Com relação ao peso corporal, observamos uma redução no grupo de camundongos IL-12p40KO ao final da infecção, ao passo que houve um aumento no grupo WT, apesar das pequenas oscilações apresentadas (Figura 1C).

Figura 1. Avaliação comportamental dos camundongos após a infecção pelo *T. cruzi*. A) Camundongos chagásicos WT (n=14) e IL-12p40KO (n=14) foram colocados em um campo aberto e avaliados visualmente quanto à atividade motora, de acordo com os parâmetros apresentados na Tabela 1 (de 0, sem paralisia, a 8, com paralisia completa dos membros anteriores). Ao passo que os camundongos WT não apresentaram quaisquer sinais de paralisia, os camundongos IL-12p40KO desenvolveram paralisia ascendente, da cauda aos membros anteriores. B) Camundongos infectados WT (n=6) e IL-12p40KO (n=8) foram submetidos ao teste do plano inclinado para a avaliação da função motora, em que indivíduos saudáveis são capazes de permanecer no plano em uma amplitude variando de 50 a 60 graus. Os dados demonstram que, após infecção, os camundongos IL12-40KO apresentaram danos na função motora, ao passo que os WT não. C) O peso corporal dos camundongos infectados WT (n=10) e IL-12p40KO (n=11) também foi avaliado, decaindo no grupo IL12-p40KO aos 41 dias após a infecção em comparação ao grupo WT, no qual o peso permaneceu estável durante o mesmo período. Os dados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão. As seguintes variáveis foram analisadas por meio da ANOVA de duas vias: (I) interação, (S) linhagem e (T) tempo. dpi, dias após a infecção.

Figura 2. Registro automático da atividade motora. O registro automático imparcial da atividade motora foi obtido de camundongos WT (n=6) e IL-12p40KO (n=8) infectados pelo *T. cruzi*. Os animais foram individualmente colocados em caixas de polietileno, equipadas com um sensor de movimentos por infravermelho. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número (A) e duração (B) dos períodos em que os camundongos permaneceram parados, número (C) e duração (D) dos pequenos movimentos e número (E) e duração (F) dos grandes movimentos. As linhagens se comportaram de modo diferente em relação ao número e duração dos períodos em que os indivíduos permaneceram parados (A e B), bem como em relação ao número e duração dos grandes movimentos (E e F). Entretanto, não houve diferença entre os grupos quanto ao número e à duração dos pequenos movimentos (C e D). Os dados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão. As seguintes variáveis foram analisadas por meio da ANOVA de duas vias: (I) interação, (S) linhagem e (T) tempo. dpi, dias após a infecção.

3.2 *Inflamação na medula espinal*

A análise microscópica da medula espinal dos camundongos WT revelou ausência de infiltrados inflamatórios e integridade morfológica tecidual, sendo claros os limites entre as substâncias branca e cinzenta (Fig. 3A). Contrariamente, muitos focos inflamatórios contendo células mononucleares e poucas polimorfonucleares foram vistos ao longo de toda a medula espinal dos camundongos IL-12p40KO, afetando a estrutura tecidual e, em alguns casos, tornando impossível a distinção entre as substâncias branca e cinzenta (Fig. 3B). De acordo com os dados de RT-PCR em tempo real, houve aumento na expressão de mRNA para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($p < 0,01$) e IFN- γ ($p < 0,01$), para as quimiocinas MIP-1 α ($p < 0,05$) e MCP-1 ($p < 0,01$) e para a óxido nítrico-sintase induzível (iNOS, $p < 0,01$) na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO chagásicos, em comparação aos WT também infectados (Tabela 2). Contudo, o mesmo não foi constatado quanto à citocina de assinatura da resposta TH-17, a IL-17, cujos níveis de transcrição gênica não se diferiram entre os grupos (Tabela 2).

Adicionalmente, um astrócito reativo (seta) entre núcleos corados com Giemsa (ponta de seta) é apresentado em J, no destaque. As secções foram imunomarcadas contra NF-200 (A e B), CD11b (E e F) e GFAP (I e J) e contra-coradas com Giemsa (com exceção à I e J) ou foram duplamente imunomarcadas contra *T. cruzi* e NF-200 (C e D), *T. cruzi* e CD11b (G e H) e *T. cruzi* e GFAP (K e L). Escalas: A, B, E, F, I e J, 50 µm; C, D, G, H, K e L, 20 µm; J destaque, 30 µm.

Figura 3. Celularidade e parasitismo na medula espinal via análise imunoistoquímica. Fotomicrografias representativas de seções da medula espinal de camundongos infectados WT (A, C, E, G, I e K) e IL-12p40KO (B, D, F, H, J e L). A) Seção intacta de uma medula espinal WT, apresentando neurônios saudáveis (setas). Em contraste, B demonstra uma secção de uma medula espinal IL-12p40KO morfológicamente danificada, rica em células infiltrantes e com poucos somas neuronais (setas). Formas amastigotas de *T. cruzi* não foram encontradas nos neurônios WT (C; seta, neurônio), porém, raramente foram vistas em neurônios IL-12p40KO (D; seta, neurônio; cabeça de seta, amastigotas). Microglias (setas) com processos longos e finos foram vistas no tecido WT (E e G). Um número elevado de macrófagos/microglias foi claramente observado nas áreas de lesão da medula espinal IL-12p40KO (F; seta, macrófago/microglia), sendo que algumas dessas células estavam infectadas pelo *T. cruzi* (H; cabeça de seta, amastigotas). Astrócitos (setas) na medula espinal imunocompetente (I e K) e IL-12p40KO (J e L). Similarmente aos neurônios, não foi encontrado nenhum astrócito infectado no tecido WT (K; seta), ao passo que no tecido IL-12p40KO, alguns poucos astrócitos parasitados ocasionalmente foram vistos (L; seta, astrócito; cabeça de seta, amastigotas).

Tabela 2. Expressão relativa de mRNA na medula espinal §

	WT (n=3)	IL-12p40KO (n=5)	Razão†
MIP-1 α	12,38 $\pm$ 2,74	642,70 $\pm$ 157,10	51,9*
MCP-1	43,43 $\pm$ 10,75	3198,00 $\pm$ 413,20	73,6**
TNF- α	35,70 $\pm$ 10,52	932,20 $\pm$ 154,20	26,1**
IFN- γ	89,14 $\pm$ 37,24	560,80 $\pm$ 76,63	6,3**
iNOS	1,80 $\pm$ 0,48	321,20 $\pm$ 62,82	178,4**
IL-17	1,14 $\pm$ 0,28	4,00 $\pm$ 0,95	3,5 ^{NS}

§ os valores representam, em vezes $\pm$ média do erro padrão, a expressão de mRNA dos grupos WT e IL-12p40KO, ambos infectados com *T. cruzi*, em relação ao grupo WT não infectado;

† razão IL-12p40KO infectado/WT infectado;

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para o grupo IL-12p40KO em comparação ao WT, de acordo com o teste *t* não pareado;

NS = não significativo.

3.3 Neurodegeneração e desmielinização na medula espinal

Na medula espinal dos camundongos WT, observamos neurônios saudáveis com somas e processos intactos (Fig. 3A), enquanto que no tecido IL-12p40KO, comumente encontramos escassos corpos neuronais e processos delgados remanescentes entre as células infiltrantes (Fig. 3B). Adicionalmente, nenhum neurônio parasitado foi visto no tecido WT (Fig. 3C), ao passo que, raramente, alguns neurônios infectados foram encontrados na medula IL-12p40KO (Fig. 3D). De acordo com a análise estereológica, a densidade neuronal estimada em toda a medula espinal apresentou queda de 60% ($p < 0,05$) nos camundongos IL-12p40KO em comparação aos WT correlativos (Fig. 4A). Ademais, diferenças estatísticas também foram observadas nas regiões torácica (queda de 74,3%; $p < 0,05$) e lombar (queda de 48,3%; $p < 0,05$; fig. 4B) do grupo IL-12p40KO, em comparação ao grupo WT.

Figura 4. Degeneração neuronal na medula espinal de camundongos IL-12p40KO. Secções da medula espinal dos camundongos IL-12p40KO paralisados (n=3) e WT pareados (n=3), infectados com *T. cruzi*, foram imunomarcadas contra NF-200 para a visualização dos neurônios e contra-coradas com Giemsa, para os núcleos totais. Nove secções por animal foram submetidas à análise estereológica para se estimar o número de neurônios. O volume da medula espinal também foi avaliado, e os dados foram usados no cálculo da densidade neuronal (neurônios/mm³). Em comparação aos camundongos WT, os camundongos IL12p40KO apresentaram queda na densidade neuronal em toda a medula espinal (A), bem como na região torácica e na intumescência lombar (B). C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar. Os dados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão. *p<0,05; de acordo com o teste *t* não pareado.

Uma vez que o glutamato torna-se neurotóxico quando presente em altas concentrações, quantificamos o nível desse neurotransmissor na medula espinal dos camundongos infectados com *T. cruzi*. De acordo com a análise microdensitométrica/morfométrica de imagem, os camundongos IL-12p40KO apresentaram aumento na área de imunomarcção ao glutamato em toda a medula espinal (153,0%; p<0,05; fig. 5A), bem como nas regiões cervical (143,0; p<0,01) e lombar (140,5%; p<0,05; fig. 5B). Já em relação à intensidade da marcação, houve diferença significativa apenas na região torácica da medula dos camundongos IL-12p40KO (aumento de 21,0%; p<0,05; fig. 5C e D).

Figura 5. Área e intensidade de imunorreatividade ao glutamato. Nove secções da medula espinal de cada camundongo WT (n=3) e IL-12p40KO (n=3), infectados com *T. cruzi*, foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem para a mensuração da área e da intensidade dos perfis de imunorreatividade discriminados ao glutamato. Os camundongos IL-12p40KO apresentaram área de imunorreatividade maior em toda a medula espinal (A) e nos segmentos cervical e lombar (B) quando comparados aos indivíduos WT. A intensidade da marcação (spMGV, unidade arbitrária) não se diferenciou entre os camundongos IL-12p40KO e WT em toda a medula espinal (C), embora fora maior na região torácica da medula espinal dos animais IL-12p40KO (D). C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar. Os dados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; de acordo com o teste *t* não pareado.

Dado o fato de que a quebra da bainha de mielina é comum em processos neurodegenerativos (Mctigue e Tripathi, 2008), aplicamos a técnica de imunoistoquímica de duas cores para a visualização de axônios mielínicos. Conforme demonstrado nas Figuras 6A e C, não houve desmielinização na medula espinal dos camundongos WT infectados. Similarmente, axônios mielinizados foram vistos nas áreas de tecido preservado da substância branca da medula espinal dos camundongos IL-12p40KO infectados (Fig. 6B), distalmente aos sítios de lesão (Fig. 6D) ou mesmo nas áreas de borda de lesão (Fig. 6E). Contudo, dentro das lesões observamos apenas restos de mielina e poucos ou mesmo nenhum axônio com

bainha de mielina intacta (Fig. 6F). Por fim, analisamos a presença do óxido nítrico nas áreas de lesão, pois além de ser um agente microbicida, o óxido nítrico também causa desmielinização via danos oxidativos (Linares et al., 2006). Aplicando-se a técnica de imunistoquímica de duas cores para a detecção de nitrotirosina (para visualização indireta de óxido nítrico) e MBP constatamos, como esperado, escassez de bainha de mielina nas áreas repletas de células infiltrantes, imunomarcadas para nitrotirosina (Fig. 6G).

Figura 6. Desmielinização na medula espinal. Secções da medula espinal dos camundongos IL-12p40KO paralisados e WT, ambos os grupos infectados com *T. cruzi*, foram duplamente imunomarcadas para a visualização das bainhas de mielina (lilás-azul) e dos axônios e somas neuronais (castanho, A-F) ou da nitrotirosina (castanho, G). Fotomicrografias representativas da medula espinal de camundongos WT (A e C) e IL-12p40KO (B, D-G). A) Medula espinal de um camundongo WT, com as substâncias branca (wm) e cinzenta (gm) preservadas. B) Secção de uma medula espinal IL-12p40KO contendo uma lesão (l). C) Campo amplificado de uma secção WT, mostrando as bainhas de mielina intactas envolvendo os axônios (cabeça de seta). Bainhas de mielina preservadas (cabeça de seta) são vistas na substância branca da medula dos camundongos IL-12p40KO, em áreas distantes às lesões (B e D) ou em seus arredores (E). F) Axônios desmielinizados (cabeças de seta) dentro de uma área de lesão. G) Bainhas de mielina escassas nas áreas de lesão, onde há muitas células infiltrantes imuno-positivas para nitrotirosina. Escalas: A, B, 200 μ m; C-F, 10 μ m; G, 100 μ m.

Figura 7. Densidade elevada de macrófagos/microglias na medula espinal de camundongos IL-12p40KO infectados. Secções da medula espinal de camundongos IL-12p40KO paralisados (n=3) e WT pareados (n=3), infectados com *T. cruzi*, foram imunomarcadas com anti-CD11b para a visualização dos macrófagos/microglais e então contra-coradas com Giemsa. Nove secções de cada animal foram submetidas à análise estereológica para se estimar o número de macrófagos/microglias totais ou apenas daqueles infectados. A densidade celular é expressa como o número de macrófagos/microglias por mm³. Em comparação aos camundongos WT, os indivíduos IL-12p40KO apresentaram um grande aumento na densidade de macrófagos/microglias em toda a medula espinal (A) bem como nas intumescências cervical e lombar (B). A densidade de células infectadas foi estimada apenas nos camundongos IL-12p40KO (C e D), pois não foram encontrados macrófagos/microglias parasitados no tecido WT. C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão. *p<0,05 e **p<0,01; de acordo com o teste *t* não pareado.

3.4 Populações de microglias e astrócitos na medula espinal dos camundongos infectados com *T. cruzi*

Poucas microglias foram vistas na medula espinal dos camundongos WT infectados, todas elas com processos longos e finos (Fig. 3E). Contrariamente, observamos muitos macrófagos/microglias arredondados e ricos em citoplasma na medula espinal dos animais IL-12p40KO, sendo que a maioria dessas células estava presente nas lesões ou em seus arredores (Fig. 3F). Em comparação ao grupo WT, os camundongos IL-12p40KO apresentaram aumento de 780,6% ($p < 0,01$) na densidade estimada de macrófagos/microglias em toda a medula espinal (Fig. 7A), aumento de 1.214,0% ($p < 0,05$) na intumescência cervical e aumento de 822,5% ($p < 0,05$) na intumescência lombar (Fig. 7B). Além disso, 36,3% ($p < 0,01$) dos macrófagos/microglias presentes em toda a medula espinal IL-12p40KO estavam infectados com *T. cruzi* (Fig. 3H e 7B), ao passo que nenhum ninho de amastigotas foi encontrado nas microglias WT (Fig. 3G, 7C e D).

intumescência cervical e na região torácica (B). Não houve diferença na intensidade da marcação (spMGV, unidade arbitrária) entre os grupos WT e IL-12p40KO (C e D). C: intumescência cervical; T: região torácica; L: intumescência lombar. Os dados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; de acordo com o teste t não pareado.

Astrócitos de corpos pequenos e processos longos e delgados foram vistos ao longo de toda a substância branca e cinzenta da medula espinal dos camundongos WT (Fig. 3I e K). Analogamente, observamos astrócitos em toda a extensão da medula IL-12p40KO, inclusive nas áreas de lesão. Entretanto, os astrócitos IL-12p40KO presentes nos sítios de lesão eram, em geral, maiores que os WT e apresentavam hipertrofia dos prolongamentos celulares, características essas compatíveis à ativação astrocitária (Fig. 3J). Formas amastigotas de *T. cruzi* não foram vistas nos astrócitos WT (Fig. 3K), mas ocasionalmente estavam presentes nas células IL-12p40KO (Fig. 3L). Em comparação ao grupo WT, os animais IL-12p40KO apresentaram maior área de imunorreatividade ao GFAP em toda a medula espinal (aumento de 317,0%; $p<0,01$; fig. 8A), bem como nas regiões cervical (aumento de 497,0%; $p<0,05$) e torácica (aumento de 229,0%; $p<0,05$; fig. 8B). Contudo, não houve diferença significativa na intensidade da marcação entre os dois grupos (Fig. 8C e D).

Figura 8. Área e intensidade de imunorreatividade ao GFAP. Após a imunomarcagem da proteína ácida fibrilar glial, presente nos astrócitos, nove secções da medula espinal de cada camundongo WT (n=3) e IL-12p40KO (n=3), infectados com *T. cruzi*, foram submetidas à análise microdensitométrica/morfométrica de imagem para a mensuração da área e da intensidade dos perfis de imunorreatividade discriminados. Em comparação aos camundongos WT, os animais IL-12p40KO apresentaram maior área de imunorreatividade ao GFAP em toda a medula espinal (A), bem como na

4 Discussão

Desde a descrição da doença de Chagas em 1909, sabe-se que a infecção pelo *T. cruzi* compromete o SNC de uma pequena fração de pacientes e, mais frequentemente, dos indivíduos imunossuprimidos (Chagas, 1909; Cardoso, 1960; Rocha et al., 1994; Marchiori et al., 2007). Entretanto, por mais de um século pouco foi feito para se elucidar os mecanismos envolvidos na afecção no SNC, a qual, por meio de dados de biópsia e sintomatologia, sabemos causar meningoencefalite, déficits neurológicos focais, *status* mental alterado, dentre outros (Rocha et al., 1994; Marchiori et al., 2007).

Em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi*, poucos estudos relatam mudanças no comportamento motor e na integridade do tecido nervoso (Michailowsky et al., 2001; Marinho et al., 2007; Bombeiro et al., 2010). No presente artigo, para melhor avaliarmos a disfunção motora observada em camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 (Marinho et al., 2007; Bombeiro et al., 2010), estudamos, em detalhe, o padrão e a progressão da paralisia e desenvolvemos uma escala com os sinais clínicos mais evidentes apresentados por esses animais. Nossa observação à respeito de uma paralisia ascendente, da cauda aos membros anteriores, foi confirmada pela análise da atividade motora espontânea e pelos dados imparciais do sistema computadorizado de sensores de movimento por raios infravermelhos. Complementarmente, o teste do plano inclinado indicou perda do tônus muscular dos membros anteriores dias antes da paralisia dos mesmos, quando apenas a cauda estava paralisada. Além disso, os camundongos IL-12p40KO também apresentaram perda de peso, provavelmente por causa dos efeitos sistêmicos da doença e, em um ponto mais tardio da infecção, por causa das limitações em segurar o alimento, decorrentes da paralisia motora.

Um número crescente de estudos tem focado nos efeitos da inflamação no SNC. Se por um lado esse processo é benéfico por restabelecer a homeostase tecidual após uma injúria, por outro, torna-se patológico quando o estímulo antigênico persiste por um período prolongado, em função do acúmulo de substâncias potencialmente neurodegenerativas. Nesse contexto, ao analisarmos a medula espinal dos camundongos IL-12p40KO completamente paralisados, observamos uma infiltração massiva de células inflamatórias, acompanhada por desorganização morfológica tecidual, produção elevada de mRNA para substâncias pró-inflamatórias, morte neuronal e aumento populacional de células da glia. Em resposta a lesões do SNC, é comum a proliferação de microglias e astrócios (Chadi et al., 2001; Andrade et al., 2008). Consideradas macrófagos residentes do SNC, as microglias atuam como a primeira

linha de defesa celular do tecido nervoso, sendo capazes de vistoriar todo o espaço extracelular do parênquima cerebral ao longo de poucas horas (Nimmerjahn et al., 2005). Além disso, alterações no microambiente podem alterar o estado de reatividade dessas células que, ativadas, liberam substâncias tóxicas quando em elevadas concentrações, tais como radicais livres, óxido nítrico, proteases e citocinas (Thery et al., 1991; Aloisi, 2001; Brown, 2007). Os astrócitos, por sua vez, não apenas atuam na fisiologia do SNC, como também desempenham funções imunológicas (Dong e Benveniste, 2001). Nesse contexto, foi demonstrado que eles produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, dentre as quais o TNF- α , a IL-6, o MCP-1 e o GM-CSF (Dong e Benveniste, 2001; Carpentier et al., 2005), que expressam receptores do tipo toll (Bsibsi et al., 2002; Carpentier et al., 2005) e até mesmo moléculas do MHC da classe II (Peudenier et al., 1991; Carpentier et al., 2005), cruciais no processo de apresentação de antígenos exógenos. Em nossos experimentos, constatamos a proliferação de ambas as populações de astrócitos e microglias na medula IL-12p40KO, acompanhada por inflamação e uma grande carga de protozoário, majoritariamente nos macrófagos/microglais.

O fato de que SNC e o sistema imune dos camundongos IL-12p40KO não tenham sido capazes de conter a infecção pelo *T. cruzi* na medula espinal reforça a importância da IL-12 e da IL-23 nesse processo. Como se sabe, a IL-12 desempenha um papel importante na diferenciação TH1 e subsequente controle do parasita. Congruente com isso, foi demonstrado que durante a fase inicial da infecção por parasitas da cepa Y de *T. cruzi*, os esplenócitos de camundongos IL-12p40KO produzem menos IFN- γ e óxido nítrico do que os seus contrapares WT (Galvao Da Silva et al., 2003). Ademais, a neutralização da IL-12 por anticorpos leva à queda na produção de IFN- γ por células do baço de camundongos WT, também infectados com parasitas da cepa Y de *T. cruzi* (Aliberti et al., 1996). Em nossos experimentos, na fase tardia da infecção, os camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 apresentaram níveis elevados de IFN- γ na medula espinal, conforme evidenciado não apenas por qRT-PCR, mas também por imunoistoquímica (Bombeiro et al., 2010) e citometria de fluxo (Marinho et al., 2007). Além disso, esse último ensaio revelou uma intensa produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ que infiltraram a medula espinal desses animais (Marinho et al., 2007). Embora a IL-12 estimule a produção de IFN- γ , sua ausência pode ser parcialmente compensada. Estudos demonstraram que células T CD4⁺ de camundongos IL-12p35KO infectados com *T. cruzi* produzem IFN- γ de forma dependente da IL-18 (Muller et al., 2001), a qual atua em sinergismo com a IL-12 quanto à síntese de IFN- γ (Dinarelli, 1999). Adicionalmente, foi reportado que a neutralização da IL-18 polariza a

resposta TH2 pelas células do baço de camundongos IL-12p40KO, frente a outros modelos de infecção (Nakanishi et al., 2001). Por outro lado, é importante ressaltar que tanto os astrócitos quanto as microglias produzem IL-18 (Conti et al., 1999), aumentando a possibilidade de que a produção local dessa citocina possa ter contribuído com os altos níveis de IFN- γ presentes na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO infectados com parasitas do clone Sylvio X10/4.

Com relação a IL-23, foi demonstrado que ela contribui com a manutenção das células TH17 (Veldhoen et al., 2006), as quais produzem a citocina pró-inflamatória IL-17. Estudos emergentes sugerem que as células TH17 estejam associadas às doenças autoimunes, tais como a esclerose múltipla (Korn, 2008) e a artrite reumatóide (Kramer e Gaffen, 2007), e que sejam importantes no controle de infecções por fungos (Huang et al., 2004) e por bactérias intracelulares (Umemura et al., 2007). Entretanto, o papel dessas células durante a infecção pelo *T. cruzi* permanece pouco compreendido. Recentemente, Cobb e colaboradores (Cobb et al., 2009) demonstraram que camundongos infectados com a cepa CL de *T. cruzi* desenvolvem uma resposta TH17 crônica na ausência de T-bet, um fator de transcrição induzível pelo IFN- γ , importante em promover a diferenciação celular TH1. Caso a IL-17 tenha participação nos mecanismos microbicidas desenvolvidos frente ao *T. cruzi*, a deficiência de IL-23 agravaria a infecção na medula espinal. Entretanto, nossos resultados não fornecem pistas sobre o envolvimento da IL-17 no controle do protozoário. Mesmo que a transcrição gênica da IL-17 seja baixa no SNC dos camundongos chagásicos IL-12p40KO, não podemos afirmar que seja defeituosa, uma vez que não há como compará-la com aquela apresentada pelos camundongos WT. Isso porque não houve colonização pelo parasita ou mesmo danos teciduais na medula espinal dos camundongos imunocompetentes e, por conseguinte, faltou o estímulo antigênico necessário para o recrutamento e ativação local das células produtoras de IL-17.

Até o presente, não sabemos qual o motivo que favoreceu a colonização da medula espinal dos camundongos IL-12p40KO pelo *T. cruzi*. Contudo, é surpreendente a alta frequência de macrófagos/microglias parasitados, em contraste aos neurônios e astrócitos. Tal fato, em conjunto aos índices nulos de parasitemia, sugere que a infectividade na medula espinal não seja decorrente de uma falha sistêmica do controle do parasita, o qual poderia secundariamente invadir o SNC, mas sim uma consequência da inabilidade dos macrófagos/microglias em controlar a proliferação local do protozoário. Corroborando essa idéia, Bastos e colegas (Bastos et al., 2002) demonstraram que os macrófagos peritoneais de camundongos IL-12p40KO apresentam capacidade prejudicada em matar formas

intracelulares de *T. cruzi*. Em um primeiro momento, a deficiência apresentada pelos macrófagos/microglias IL-12p40KO em eliminar o parasita é algo inesperado se levarmos em consideração o alto nível de IFN- γ produzido localmente na medula espinal dos camundongos imunossuprimidos. Uma possível hipótese para explicar porque a exposição dos macrófagos/microglias ao IFN- γ não foi suficiente em gerar uma resposta eficaz contra proliferação do *T. cruzi*, consiste no possível déficit de *priming* dessas células. O *priming* de fagócitos mononucleares é um elemento crucial para a eliminação de parasitas intracelulares. Nesse processo, o IFN- γ produzido localmente ou sistemicamente atua na célula à distância, antes que ela entre em contato com o microrganismo. Logo, o fagócito permanece em um estado de reatividade mais elevado, o qual é torna-se evidente após a internalização do parasita (Franklin et al., 2009). Assim, na possível ausência de *priming* dos macrófagos/microglias, podemos presumir que o *T. cruzi* teve tempo hábil de evadir do vacúolo fagocítico antes mesmo que o fagócito deflagrasse mecanismos microbicidas após o contato com linfócitos T CD4⁺, recrutados ao local da infecção. O *priming* deficiente dos macrófagos/microglias IL-12p40KO poderia ser decorrente de baixos níveis basais de IFN- γ (Tessema et al., 2009). Em função da escassez de IFN- γ , os fagócitos IL-12p40KO não sofreriam mudanças epigenéticas para a diferenciação M1, mas possivelmente para M2, caracterizada por um fenótipo brando no controle de parasitas intracelulares devido aos baixos níveis de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio produzidos (Mantovani et al., 2004). Apoiando essa possibilidade, foi demonstrado que macrófagos peritoneais de camundongos IL-12p40KO se comportam como células M2 frente ao *T. cruzi*, demonstrando baixa responsividade aos efeitos pró-inflamatórios do IFN- γ *in vitro* (Bastos et al., 2002).

Além do *priming* deficiente, os camundongos IL-12p40KO poderiam apresentar uma produção muito baixa de IFN- γ no início da infecção pelo *T. cruzi* (Aliberti et al., 1996; Galvao Da Silva et al., 2003), acarretando em uma resposta imune ineficaz à proliferação ascendente do parasita. Desse modo, níveis mais elevados de IFN- γ produzidos tardiamente não seriam suficientes para o controle da infecção, em vista do grande número de parasitas então existentes na medula espinal dos camundongos imunossuprimidos. Experimentos referentes à cinética de produção de IFN- γ na medula espinal de camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi*, bem como ao padrão de diferenciação das microglias (M1 ou M2), encontram-se em andamento.

Apesar do controle ineficaz do parasita na medula espinal dos camundongos IL12-p40KO, o acúmulo de moléculas efetoras liberadas pelos macrófagos/microglias, tais qual o óxido nítrico ou outros compostos oxidativos, causa um impacto negativo na viabilidade dos

neurônios. Tal interpretação está de acordo com o estudo de Garcia *et al.* (Garcia et al., 1999), no qual foi relatado que o bloqueio *in vivo* da produção de óxido nítrico reduz a perda de neurônios do cólon de ratos infectados com *T. cruzi*. Entretanto, além das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, outros elementos também podem estar envolvidos no processo de neurodegeneração aqui observado, dentre eles o glutamato. A baixa captação de glutamato pelas células da glia durante condições inflamatórias tem sido alvo de muitos estudos relacionados a desordens neurológicas (Tilleux e Hermans, 2007). Embora o glutamato desempenhe um papel central nas sinapses excitatórias, o estímulo excessivo de seus receptores ocasiona a morte neuronal (Foran e Trotti, 2009). Estudos demonstraram que sob condições patológicas, a liberação de mediadores pró-inflamatórios por microglias e astrócitos ativados, como o TNF- α , a IL-1 β e o óxido nítrico, contribui com o processo neurodegenerativo por prejudicar a reabsorção de glutamato pelos próprios astrócitos (Chao e Hu, 1994; Rothwell et al., 1997; Bal-Price et al., 2002). Em linha com esses dados, a queda na densidade de neurônios da medula espinal dos camundongos chagásicos IL-12p40KO foi acompanhada por um aumento populacional de células da glia e por níveis elevados de mRNA para iNOS, TNF- α e quimiocinas pró-inflamatórias, além de uma maior área de imunorreatividade ao glutamato.

Dado o fato de que algumas doenças neurodegenerativas são acompanhadas por processos de desmielinização (Korn, 2008; Mctigue e Tripathi, 2008), investigamos a ocorrência de axônios amielínicos na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO infectados. Como era de se esperar, constatamos quebra da bainha de mielina apenas nos sítios de lesão, os quais estavam positivamente marcados para nitrotirosina. Tal observação está de acordo com estudos que demonstram a morte de oligodendrócitos e subsequente perda de mielina durante a inflamação em decorrência aos danos oxidativos (Dewar et al., 2003), à produção de citocinas pró-inflamatórias (Eizenberg et al., 1995; Hisahara et al., 1997) e à excitotoxicidade glutamatérgica (Matute et al., 1997).

Em suma, nossos dados indicam que na ausência de IL-12 e IL-23, o *T. cruzi* se dissemina facilmente pela medula espinal. Consequentemente, as populações de macrófagos/microglias e de astrócitos tornam-se aumentadas, em um esforço de conter a infecção. Entretanto, a persistência do parasita em decorrência de uma resposta imune ineficaz leva ao acúmulo de substâncias potencialmente neurotóxicas, como o óxido nítrico e o glutamato. Assim, como resultado do processo neurodegenerativo, a disfunção motora é estabelecida.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Dra. Sanae Kasahara (Univesidade Estadual Paulista, Brasil) pelo auxílio na aquisição de imagens, ao Dr. Carlos Penha-Gonçalves e Lígia Antunes Gonçalves (Instituto Gulbenkian de Ciência, Portugal) pela assistência com o qRT-PCR para as quimiocinas e ao Rogério Silva do Nascimento, Meire Hiyane e Thereza Florence Dinucci pelo suporte técnico. Suporte financeiro: FAPESP e CNPq.

V CAPÍTULO III

A disseminação descontrolada do *Trypanosoma cruzi* na medula espinal de camundongos deficientes em IL-12p40 correlaciona-se com a transcrição tardia de IFN- γ

Bombeiro AL^{1,2}; Gonçalves, LA³; Penha-Gonçalves, C³; Marinho, CRF⁴, D'Império Lima MR¹, Chadi G² e Álvarez JM¹

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

² Centro de Neuroregeneração, Departamento de Neurologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP Brasil

³ Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

⁴ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Resumo

A doença de Chagas é uma protozoose latino-americana causada pelo *Trypanosoma cruzi*, o qual pode colonizar o SNC de hospedeiros imunossuprimidos. Camundongos deficientes em IL-12p40 (IL-12p40KO) infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 desenvolvem paralisia motora ascendente e apresentam, no ponto mais tardio da infecção, intensa inflamação na medula espinal (ME), acompanhada de parasitismo elevado e alta produção local de IFN- γ e óxido nítrico. Contrariamente, camundongos imunocompetentes (WT) infectados não apresentam qualquer sinal de dano do SNC. Com base no exposto, avaliamos a cinética do parasitismo e da inflamação na ME de camundongos WT e IL-12p40KO infectados pelo *T. cruzi*, bem como a contribuição das microglias nesse processo. **Métodos:** Camundongos fêmeas WT e IL-12p40KO infectados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 foram semanalmente submetidos às análises de comportamento motor e de parasitemia, seguidas de perfusão transcardíaca e remoção da medula espinal para RT-PCR em tempo real. Microglias de neonatos de ambas as linhagens foram tratadas com rIFN- γ , infectadas e analisadas quanto à permissividade à infecção e quanto à produção de óxido nítrico. **Resultados:** Os camundongos IL-12p40KO desenvolveram paralisia ascendente e parasitemia branda, enquanto que os animais WT não apresentaram distúrbios motores e tampouco parasitas circulantes no sangue periférico. Em ambos os grupos, encontramos rRNA 18S de *T. cruzi* na ME. Contudo, ao passo que o parasitismo foi controlado no tecido WT, decaindo a partir da

quinta semana após a infecção, ele ascendeu no grupo IL-12p40KO ao longo do tempo. Similarmente, o nível de mRNA para TNF α , CD3, IFN- γ , iNOS e IL-10 decaiu no grupo WT por volta da quarta ou quinta semana após a infecção, porém, manteve-se ascendente no grupo IL-12p40KO ao longo do tempo. Interessantemente, o nível ótimo de mRNA de IFN- γ apresentado pelos animais WT na terceira semana após a infecção somente foi alcançado pelos camundongos IL-12p40KO com uma semana de atraso aproximadamente. As microglias de ambas as linhagens tratadas *in vitro* com rIFN- γ apresentaram a mesma permissividade ao *T. cruzi* e igual produção de óxido nítrico. **Conclusão:** a baixa produção de mediadores inflamatórios nas primeiras semanas de infecção, em especial do IFN- γ , acompanhada da ineficiência dos fagócitos em eliminar o parasita, possibilitou a infecção descontrolada da ME IL-12p40-KO. Em vista da persistência do protozoário, observamos na fase mais tardia da infecção um processo inflamatório intenso e danos da função motora.

1 Introdução

A doença de Chagas é uma protozoose latino-americana causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Durante a fase aguda da doença, os pacientes podem apresentar febre, hepato, linfo e esplenomegalia, além de intensos processos inflamatórios associados com o parasitismo tecidual. Durante a fase crônica, as desordens mais comumente observadas são a cardiomiopatia e as megassíndromes digestivas (Morel e Lazdins, 2003; Junqueira et al., 2010; Rassi et al., 2010). Entretanto, não menos frequente, alguns pacientes podem permanecer assintomáticos por muitos anos ou mesmo por toda a vida (Rassi et al., 2010).

Em resposta à presença do *T. cruzi*, as células apresentadoras de antígenos liberam IL-12 e TNF α , enquanto que as células NK produzem IFN- γ que, por sua vez, induz os fagócitos a sintetizarem substâncias tripanosomicidas, como os intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio. Concomitantemente, as células dendríticas migram aos órgãos linfóides secundários, onde estimulam, via IL-12, a diferenciação e expansão das células TH1 CD4⁺ e T CD8⁺. Uma vez recrutados ao sítio da infecção, os linfócitos TH1 atuam não somente na ativação dos fagócitos, que subsequentemente destroem os parasitas internalizados. Mais ainda, linfócitos CD4⁺ TH1 auxiliam na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, os quais produzem anticorpos específicos ao *T. cruzi*. Os linfócitos T CD8⁺, por sua vez, lisam as células parasitadas (Junqueira et al., 2010). É válido lembrar que apesar de todos os mecanismos efetores empregados para conter a infecção, o *T. cruzi* é capaz de evadir do

sistema imune (Erdmann et al., 2009; Benitez-Hernandez et al., 2010) invadindo, assim, novas células.

O comprometimento do SNC em decorrência da infecção pelo *T. cruzi* tem sido relatado desde a descrição da doença de Chagas (Chagas, 1909), ocorrendo não apenas em crianças, mas também em pacientes imunossuprimidos pelo HIV ou por drogas que evitam a rejeição de transplantes. Nesses casos, os pacientes podem apresentar meningoencefalite, déficits neurológicos, paralisia motora, coma e até mesmo morte (Leiguarda et al., 1990; Rosenberg et al., 1992; Rocha et al., 1994; Marchiori et al., 2007; Almeida et al., 2010). Poucos estudos foram realizados à respeito da infecção no SNC, a qual permanece pobremente compreendida. Recentemente, demonstramos que camundongos deficientes em IL-12/IL-23 (IL-12p40KO) infectados com parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* desenvolvem paralisia motora severa, culminante em morte. Além do mais, quando completamente paralisados, esses animais apresentam intensa inflamação na medula espinal, acompanhada de elevada produção local de IFN- γ e de óxido nítrico e, curiosamente, de alta carga parasitária (Bombeiro et al., 2010). Por outro lado, os camundongos chagásicos imunocompetentes (WT) nunca apresentam danos motores, bem como nenhum sinal de inflamação e parasitismo na medula espinal. Baseados nesses dados, avaliamos a cinética de inflamação e de parasitismo pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4 na medula espinal de camundongos IL-12p40KO e WT, bem como a contribuição das microglias nesse processo.

2 Materiais e Métodos

2.1 Camundongos, parasitas e infecção

Camundongos fêmeas C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes em IL-12/IL-23 (IL-12p40KO) com fundo genético C57BL/6, de oito a dez semanas de idade, foram alojados no Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos sob condições SPF (“specific pathogen free”), em ciclos alternados de dia e noite (12 h cada), com temperatura e umidade controladas e alimentados *ad libitum*. Os camundongos foram infectados intraperitonealmente com 10^5 formas tripomastigotas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* (Miles, 1974) obtidas de culturas de células LLCMK2. Quando os indivíduos IL-12p40KO apresentaram déficits neurológicos, a água e a ração foram colocadas no chão da gaiola. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Ética em Experimentação Animal vigente e os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Saúde Animal da Universidade de São Paulo.

2.2 Avaliação clínica e eutanásia

Uma vez por semana, camundongos WT (n=4) e IL-12p40KO (n=4) infectados com *T. cruzi* foram individualmente colocados em um campo aberto e observados quanto à atividade motora espontânea, de acordo com a Tabela 1 do Capítulo II. Após a avaliação comportamental, 5 µL de sangue obtido da veia caudal foram examinados ao microscópio de luz para a quantificação da parasitemia, conforme descrito na literatura (Brenner, 1962). Em seguida, os camundongos foram profundamente anestesiados com cetamina e xilazina (Vetbrands) e perfundidos transcardiacamente com 10 mL de solução salina isotônica, em temperatura ambiente. O coração e a porção superior da intumescência lombar da medula espinal foram submetidos à análise histopatológica, ao passo que a porção inferior da intumescência lombar foi submetida aos procedimentos de RT-PCR em tempo real, descritos a seguir.

2.3 Análise histopatológica

Após a perfusão transcardíaca, o coração e a porção superior da intumescência lombar da medula espinal foram imediatamente fixados em formalina 4% (Merck, Brasil) *overnight*, seguida de álcool 70%. Os tecidos foram embebidos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina-eosina (HE). Sob aumento de 400x, analisamos 50 campos aleatórios ao longo de seis secções não consecutivas do coração, enquanto que para a medula espinal, observamos a área total de 3 secções não adjacentes. O número de infiltrados inflamatórios (aqueles com mais de 10 células) e de ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* foram registrados.

2.4 Quantificação relativa do mRNA por RT-PCR em tempo real

Camundongos WT (n=4 indivíduos por semana) e IL-12p40KO (n=4 indivíduos por semana) infectados com *T. cruzi*, bem como camundongos WT (n=4) e IL-12p40KO (n=4) não infectados, tiveram a porção inferior da intumescência lombar da medula espinal removida, imediatamente congelada em gelo seco e mantida em nitrogênio líquido. O RNA total foi isolado do tecido utilizando-se fenol ácido (TriZol, Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e a concentração de RNA de cada amostra foi estimada por meio de um kit de quantificação de RNA por fluorescência (Quant-it, Invitrogen). As amostras foram incubadas com DNase para a digestão de DNA contaminante e a transcrição reversa foi realizada a partir 2 µg de RNA total, utilizando-se primers aleatórios, tampão de reação, DTT, DNTP e SS-II RT (Invitrogen). A amplificação se deu por meio de um sistema de PCR em

tempo real (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems, Portugal), com o uso do reagente SYBR Green e dos primers para rRNA 18S de *Trypanosoma cruzi* (FW: TTGAATTGAGGGCCTCTAAGG; RW: AAAGGTACCACTCCCGTGTTT), TNF α (FW: AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT; RW: CCACTTGGTGGTTTGCTACGA), IFN- γ (FW: CCACTGTCATCTTGGCTTTG; RW: TCTGGCTCTGCAGGATTTTC), CD3 (FW: TCTCGGAAGTCGAGGACAGT; RW: ATCAGCAAGCCCAGAGTGAT), IL-10 (FW: CTCATGGGTCCTGGGAAGAG; RW: CATTCCCAGAGGAATTGCAT) e HPRT (FW: GTGGACTTCATTCGCCTCAAG; RW: TCTCCACCGATAACTTTGATTTCA). Quanto à iNOS, a amplificação foi realizada usando-se o reagente TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI, Portugal) com o ensaio de expressão gênica TaqMan (Mm00440502_m1, ABI). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do sistema de PCR em tempo real. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os níveis de mRNA obtidos foram normalizados em função de um gene endógeno de referência (β -actina para iNOS ou HPRT para os demais) e, então, relativizadas à amostra controle (camundongos não infectados) aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os valores obtidos para a produção de mRNA foram expressos como a diferença, em número de vezes, em relação ao controle. Para a quantificação absoluta do rRNA 18S de *T. cruzi*, os valores das amostras foram aplicados à equação da reta de uma curva-padrão, construída a partir de uma amostra padrão com número conhecido de cópias de rRNA 18S de *T. cruzi*.

2.5 Cultura de microglias

A cultura primária de células gliais e o isolamento das microglias foram realizados de acordo com Neumann et al., (Neumann et al., 1998), após pequenas modificações. Em suma, os cérebros de camundongos neonatos WT e IL-12p40KO com 3 a 5 dias de vida foram triturados mecanicamente após a remoção das meninges, transferidos para um tubo de centrífuga contendo PBS 0,1 M e mantidos em gelo durante 5 min. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi coletado, centrifugado (1500 rpm, 5 min, 4° C) e as células totais foram cultivadas em meio de cultura (DMEM-F12, Gibco, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, USA). As culturas foram mantidas em ambiente controlado (37° C, 5% CO₂) por 14 dias, para a formação de uma monocamada glial. Após esse período, as culturas foram agitadas em um agitador orbital (200 rpm, 2 h) e o sobrenadante enriquecido de microglias foi coletado e centrifugado (1500 rpm, 5 min, 4° C). As células foram transferidas para lâminas ou placas de cultivo celular e,

após 1h, foram lavadas com PBS 0,1 M para a remoção das células não aderentes. A pureza das microglias isoladas foi igual ou superior a 95%, confirmada por citometria de fluxo com anticorpos anti-CD11b marcados com FITC (BD Biosciences, USA).

2.6 Infectividade das microglias pelo *T. cruzi*

Após o isolamento, as microglias foram cultivadas em lâminas de cultivo celular de oito poços (Lab-Tek, USA, 50×10^3 células/poço) e tratadas ou não com IFN- γ recombinante (rIFN- γ , Pharmingen, USA) a uma concentração de 4, 20 ou 100 pg/mL, diluído em meio de cultura suplementado, por 48 h. As células foram lavadas 3x com PBS 0.1 M e, então, infectadas com *T. cruzi* Sylvio X10/4 a uma razão de 1 parasita: 1microglia, por 2 h. As culturas foram novamente lavadas 3x com PBS 0.1 M para a remoção dos parasitas extracelulares e mantidas em meio por mais 48 h. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% (30 min) e coradas com HE. Sob aumento de 1000x, analisamos 100 células por poço e registramos o número de formas amastigotas de *T. cruzi* por célula infectada, de tal modo que foi possível calcular a porcentagem de células infectadas, bem como o número de formas amastigotas por célula infectada. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

2.7 Detecção de óxido nítrico no sobrenadante das culturas microgliais

Microglias isoladas foram cultivadas em placas de 96 poços (200×10^3 células/poço), tratadas ou não com rIFN- γ e infectadas com *T. cruzi*, conforme descrito acima. Para a mensuração do óxido nítrico, 50 μ L de sobrenadante foram incubados com 50 μ L de reagente de Griess (5min, temperatura ambiente) e a concentração de NO_2^- foi determinada pela leitura da densidade óptica (540 nm) em referência a uma curva-padrão, obtida a partir da diluição seriada de uma solução-padrão de NaNO_2 . Como controle positivo, incubamos com LPS (25 μ g/mL; 48 h) algumas culturas previamente tratadas com rIFN- γ (100 pg/mL).

2.8 Análise estatística

Empregamos a análise de variância (ANOVA) de duas vias quando comparadas as linhagens pareadas WT e IL-12p40KO ao longo de um decurso temporal, ou quando submetidas a diferentes tratamentos. Para a comparação de dois ou mais grupos pertencentes a uma mesma linhagem (WT vs. WT ou IL-12p40KO vs. IL-12p40KO), aplicamos a ANOVA de uma via. Em todas as análises, aplicamos o pós-teste Bonferroni. Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro-padrão. Valores probabilísticos (p) $<0,05$ foram considerados

significativos. Todos os testes foram realizados pelo programa PRISM 4 (Graph-Pad Software).

3 Resultados

3.1 Parasitemia, danos motores e parasitismo cardíaco

Segundo a literatura, parasitas do clone Sylvio X10/4 de *Trypanosoma cruzi* não causam parasitemia patente em camundongos imunocompetentes (Postan et al., 1983; Marinho et al., 2007). Conforme esperado, não observamos parasitas circulantes no sangue dos camundongos WT ao longo da infecção (Fig. 1A), ao passo que nos camundongos IL-12p40KO, constatamos parasitemia branda com pico na quarta semana após a infecção (Fig. 1A). De acordo com a avaliação clínica do comportamento motor, os camundongos WT não apresentaram qualquer sinal de dano motor ao longo do tempo (Fig. 1B). Em contrapartida, os animais IL-12p40KO desenvolveram uma paralisia motora ascendente, a qual teve início na quarta semana após a infecção e término na sexta semana, com a morte dos indivíduos remanescentes. Em momento algum observamos a recuperação dos movimentos (Fig. 1B). A análise histopatológica revelou alguns poucos ninhos de formas amastigotas de *T. cruzi* no coração dos camundongos WT no decorrer do experimento (Fig. 1C). Em compensação, os camundongos IL-12p40KO começaram a apresentar parasitismo cardíaco a partir da segunda semana após a infecção, cujo pico se deu na quarta semana. Após esse período, houve uma grande queda no nível de infecção cardíaca, o qual, porém, não se anulou (Fig. 1C). No coração WT, o número de focos inflamatórios foi baixo nos tempos avaliados, enquanto que nos camundongos IL-12p40KO foi maior em alguns pontos, atingindo o pico na quarta semana após a infecção e não se anulando a partir de então (Fig. 1D).

desenvolveram uma parasitemia branda, cujo pico se deu na quarta semana após a infecção. B) Nenhum sinal de paralisia foi observado nos camundongos WT ao longo do decurso temporal, contrariamente aos camundongos IL-12p40KO, que apresentaram uma paralisia ascendente, da cauda aos membros anteriores. No grupo IL-12p40KO, a paralisia começou na quarta semana após a infecção, progredindo até a sexta semana, a partir de quando os camundongos remanescentes morreram. Poucos ninhos de amastigotas (C) e poucos focos inflamatórios (D) foram vistos no coração WT, ao contrário dos camundongos IL-12p40KO que na quarta semana após a infecção, atingiram o pico de parasitismo (C) e o pico de inflamação (D). Figuras representativas de ninhos de amastigotas (C, setas) e focos inflamatórios (D, setas) no tecido cardíaco WT (fotomicrografias à esquerda, C e D) e IL-12p40KO (fotomicrografias à direita, C e D) na quarta semana após a infecção. Na fotomicrografia à esquerda em C, demonstramos uma secção de um coração WT livre de ninhos de amastigotas. Coloração: HE; escala: 20 μ m. Média $\pm$ erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, onde (I) interação, (S) linhagens de camundongo e (T) tempo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos pareados de camundongos WT e IL-12p40KO, de acordo com o pós-teste Bonferroni. $n=4$ para cada grupo em cada tempo.

Figura 1. Parasitemia, danos motores e lesão cardíaca. Camundongos fêmeas C57BL/6 WT e IL-12p40KO de seis a oito semanas de idade foram infectados i.p. com 10^5 formas tripomastigotas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* e avaliados semanalmente quanto à atividade motora (de acordo com a Tabela 1 do Capítulo II, de zero, ausência de paralisia, a 8, paralisia completa dos membros) e quanto aos parasitas circulantes no sangue. Em seguida, os camundongos foram perfundidos e o tecido cardíaco foi analisado quanto à presença de ninhos de amastigotas e focos inflamatórios. A) Enquanto que os camundongos WT não apresentaram parasitas circulantes no sangue, os camundongos IL-12p40KO

construída a partir de uma amostra com número conhecido de cópias de rRNA 18S de *T. cruzi*. De acordo com o gráfico, os camundongos IL-12p40KO apresentaram parasitismo ascendente, enquanto que os animais WT limitaram a infecção na terceira semana após a infecção, a qual decaiu a partir da quinta semana. Figuras representativas da intumescência lombar da medula espinal de camundongos WT (fotomicrografia superior) e IL-12p40KO (fotomicrografia inferior), na sexta semana após a infecção. Note a presença de ninhos de amastigotas (setas) no tecido IL-12p40KO. Escala: 20 μ m. Média $\pm$ media do erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, onde (I) interação, (S) linhagem de camundongo e (T) tempo. *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos pareados de camundongos WT e IL-12p40KO, de acordo com o pós-teste Bonferroni. $n=4$ para cada grupo em cada tempo.

3.2 Parasitismo na medula espinal

De acordo com a análise histopatológica da medula espinal, nenhum ninho de amastigota foi visto no grupo WT nos tempos analisados, enquanto que nos camundongos IL-12p40KO, somente após a quinta ou sexta semana de infecção, encontramos parasitas intracelulares. Contudo, ao investigarmos o parasitismo na medula espinal por qRT-PCR, encontramos rRNA 18S de *T. cruzi* no grupo WT logo no início da infecção, sendo que o parasitismo persistiu ao longo de todo o decurso experimental, atingindo o pico máximo na quinta semana após a infecção e decaindo a partir de então (Fig. 2). Com relação aos animais IL-12p40KO, observamos transcritos do parasita também na primeira semana após a infecção, sendo que nesse mesmo grupo o parasitismo ascendeu até o final do experimento (Fig. 2). É importante ressaltar que na segunda semana após a infecção, os camundongos IL-12p40KO já apresentavam uma quantidade de rRNA de *T. cruzi* tão elevada quanto ao nível máximo de transcritos que os indivíduos WT apresentariam ao longo de todo o decurso experimental (Fig. 2).

Figura 2. Parasitismo na medula espinal. Após a perfusão transcárdica, segmentos da medula lombar foram processados para a extração de RNA e produção de cDNA. Na PCR em tempo real, utilizamos primers para as sequências 18S de rRNA de *T. cruzi* e de HPRT como controle endógeno. Na quantificação absoluta, os valores obtidos foram aplicados à equação da reta de uma curva-padrão,

3.3 Inflamação na medula espinal

Ao analisarmos a medula espinal por microscopia de luz, constatamos a presença de infiltrados inflamatórios nos grupos WT e IL-12p40KO somente a partir da quarta semana após a infecção. Ao passo que no tecido WT observamos poucas células infiltrantes, na medula IL-12p40KO nos deparamos com uma grande quantidade de focos inflamatórios, principalmente ao final do decurso experimental (dados não mostrados). Enquanto que a morfologia da medula espinal dos animais WT permaneceu preservada (Fig. 3A), observamos no grupo IL-12p40KO um grande desarranjo morfológico, decorrente de uma intensa resposta inflamatória (Fig. 3B). Células mono e poucas polimorfonucleares foram vistas na medula espinal dos indivíduos WT e IL-12p40KO (Fig. 3A e B, destaque). Ao analisarmos a presença de moléculas envolvidas na inflamação, constatamos que no grupo WT a produção máxima de mRNA para TNF α , CD3, IFN- γ , iNOS e IL-10 ocorreu, em geral, na quarta ou quinta semana após a infecção, decaindo a partir de então (Fig. 3C-G). Com relação aos camundongos IL-12p40KO, o nível transcricional dessas moléculas mostrou-se ascendente ao longo do decurso temporal, nunca diminuindo (Fig. 3C-G). Vale ressaltar que nas primeiras semanas após a infecção, a produção de mRNA das moléculas acima mencionadas foi maior no grupo WT em relação aos animais IL-12p40KO. Entretanto, a partir da quarta semana após a infecção houve uma inversão no perfil transcrição gênica entre os dois grupos, coincidente com o período em que os animais IL-12p40KO começaram a apresentar danos motores (Fig. 1B e Fig. 3). Além do mais, é interessante notar que para todas as moléculas estudadas, os níveis de mRNA apresentados pelos animais WT na terceira semana após a infecção somente foram alcançados pelos camundongos IL-12p40KO com ao menos uma semana de atraso, ou seja, a partir da quarta semana (Fig. 3C-G).

camundongos WT (A) e IL-12p40KO (B) na sexta semana após a infecção, coradas com HE. Escala: A e B, 100 μ m; destaques, 20 μ m. Média $\pm$ media do erro padrão. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, onde (I) interação, (S) linhagem de camundongo e (T) tempo. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos pareados de camundongos WT e IL-12p40KO, de acordo com o pós-teste Bonferroni. $n=4$ para cada grupo em cada tempo.

Figura 3. Inflamação na medula espinal. Após a perfusão transcardíaca, a porção anterior da intumescência lombar dos camundongos WT e IL-12p40KO foi submetida à análise histopatológica. Enquanto que a medula WT manteve-se íntegra (A), apresentando poucas células inflamatórias (seta, destaque), observamos um intenso desarranjo morfológico na medula espinal IL-12p40KO (B), decorrente da grande quantidade de focos inflamatórios (setas, destaque). O cDNA obtido da porção inferior da intumescência lombar dos animais WT e IL-12p40KO foi submetido à PCR em tempo real, visando a expressão gênica do $TNF\alpha$ (C), CD3 (D), $IFN-\gamma$ (E), iNOS (F), IL-10 (G) e HPRT como controle endógeno. A partir da quarta semana após a infecção, a transcrição dos genes analisados tendeu à remissão no grupo WT, ao passo que permaneceu ascendente nos camundongos IL-12p40KO. Note que após a quarta semana de infecção houve uma inversão no perfil de expressão gênica de todas as moléculas entre os grupos WT e IL-12p40KO. Fotomicrografias representativas da medula espinal de

3.4 Infectividade microglial e capacidade de destruição do parasita

No capítulo anterior, demonstramos que as microglias são o principal alvo de colonização dos parasitas do clone Sylvio X10/4 de *T. cruzi* que penetram na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO. Em vista disso, investigamos a permissividade dessas células à infecção e a capacidade delas em eliminar o parasita *in vitro*. Microglias WT e IL-12p40KO pré-tratadas ou não com rIFN- γ (48 h) foram infectadas com *T. cruzi* a uma razão de uma microglia para um parasita. Após 48 h, as células foram analisadas quanto à presença de formas amastigotas de *T. cruzi*. De acordo com os dados obtidos, aproximadamente 60% das células de ambas as linhagens de camundongos permaneceram infectadas na ausência de rIFN- γ (Fig. 4A). Esse percentual se manteve nas culturas WT previamente tratadas com 4 pg/mL de rIFN- γ , decaindo para aproximadamente 45% ($p < 0,05$) e 25% ($p < 0,001$) quando do pré-tratamento com 20 e 100 pg/mL de rIFN- γ , respectivamente (Fig. 4A). Com relação às microglias IL-12p40KO, a adição de apenas 4 pg/mL de rIFN- γ foi suficiente para reduzir a taxa de infectividade pela metade ($p < 0,001$; Fig. 4A), a qual se manteve ao redor de 30% quando do pré-tratamento com 20 ou 100 pg/mL de rIFN- γ (Fig. 4A). Não foram observadas diferenças na porcentagem de infecção entre as culturas WT e IL-12p40KO submetidas ao mesmo tratamento, exceto da administração de 4 pg/mL de rIFN- γ , quando mais células WT permaneceram infectadas ($p < 0,001$; fig. 4A). Com relação à capacidade de destruição dos parasitas intracelulares, não observamos qualquer diferença na taxa de amastigota por microglia infectada entre os grupos WT e IL-12p40KO submetidos aos mesmos tratamentos (Fig. 4B). Contudo, o pré-tratamento com 4 pg/mL de rIFN- γ mostrou-se eficaz no controle parcial da proliferação do parasita, reduzindo o número de amastigotas por célula infectada nas culturas WT (de aproximadamente oito para cinco, $p < 0,001$) e IL-12p40KO (de sete para quatro, $p < 0,001$; Fig. 4B e C). O estímulo das microglias WT ou IL-12p40KO com 20 ou 100 pg/mL de rIFN- γ não reduziu significativamente o número de parasitas por célula, em comparação ao tratamento com 4 pg/mL de rIFN- γ (Fig. 4B).

Figura 4. Infectividade microglial e capacidade de eliminação do parasita. Microglias WT e IL-12p40KO tratadas ou não com rIFN- γ (4, 20 e 100pg/mL) foram infectadas com *T. cruzi* (razão de 1:1) e analisadas quanto à presença de parasitas intracelulares. A) Nenhuma diferença na porcentagem de células infectadas foi observada entre às culturas WT e IL-12p40KO submetidas aos mesmos tratamentos, com exceção da adição de 4 pg/mL de rIFN- γ , quando menos células IL-12p40KO permaneceram infectadas. Note uma queda gradual na taxa de infectividade quando as células WT foram tratadas com 20 pg/mL e 100 pg/mL de rIFN- γ . Quanto às culturas IL-12p40KO, a taxa de infectividade foi reduzida pela metade quando as células foram tratadas com 4 pg/mL de rIFN- γ , mantendo-se constante a partir de então. B) Com relação ao número de formas amastigotas de *T. cruzi* por célula infectada, não houve diferença entre os grupos WT e IL-12p40KO submetidos aos mesmos tratamentos. Entretanto, quando as células da mesma linhagem foram estimuladas com 4 pg/mL de rIFN- γ , o número de amastigotas diminuiu em comparação às células não tratadas. Nenhuma diferença foi vista entre os grupos de uma mesma linhagem tratados com 4, 20 ou 100 pg/mL de rIFN- γ . C) Figuras representativas de culturas microgliais WT e IL-12p40KO não tratadas (0pg/mL) ou tratadas com rIFN- γ (4pg/mL) e infectadas com *T. cruzi*. Coloração: HE. Escala: 10 μ m. Média $\pm$ erro padrão. ***p<0,001 quando comparados os grupos pareados de camundongos WT e IL-12p40KO, de acordo com o pós-teste Bonferroni. Os dados são apresentados como a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Contudo, em comparação ao tratamento com 4 pg/mL de rIFN- γ , a adição de 20 ou 100 pg/mL de rIFN- γ não alterou a produção de nitrito entre as culturas de uma mesma linhagem. Média $\pm$ erro padrão. Os dados são apresentados como a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata.

3.5 Produção de óxido nítrico

Uma vez que o óxido nítrico apresenta propriedade tripanossomicida (Petray et al., 1995), investigamos a produção dessa molécula via mensuração de nitrito no sobrenadante das culturas microglicais WT e IL-12p40KO, pré-tratadas ou não com rIFN- γ (4, 20 e 100 pg/mL) e infectadas com *T. cruzi*. Nenhuma diferença foi observada entre as culturas WT e IL-12p40KO submetidas aos mesmos tratamentos (Fig. 5). Contudo, ao analisarmos a produção de nitrito dentro de uma mesma linhagem celular, constatamos que o pré-tratamento com 4 pg/mL de rIFN- γ foi capaz de elevar a concentração desse metabólito tanto nas culturas WT ($p < 0,05$) quanto nas IL-12p40KO ($p < 0,05$; fig. 5). Curiosamente, a adição de 20 ou 100 pg/ml de rIFN- γ não alterou significativamente a síntese de óxido nítrico em comparação ao tratamento com 4 pg/mL de rIFN- γ , em ambas as linhagens (Fig. 5). Vale ressaltar que as culturas WT e IL-12p40KO não tratadas com rIFN- γ não apresentaram, entre si, alterações significativas na produção de nitrito após a infecção com *T. cruzi* (Fig. 5). Como controle positivo, estimulamos com LPS (25 μ g/mL) algumas culturas previamente tratadas com 100 pg/mL de rIFN- γ (Fig. 5).

Figura 5. Produção de óxido nítrico pelas microglias. Microglias WT e IL-12p40KO tratadas ou não com rIFN- γ (4, 20 e 100 pg/mL) foram infectadas com *T. cruzi* (razão de 1:1) e o sobrenadante das culturas foi analisado quanto à presença de óxido nítrico, via mensuração de NO_2^- . Como controle positivo, utilizamos LPS (25 μ g/mL). Nenhuma diferença na produção de NO_2^- foi observada entre as culturas WT e IL-12p40KO submetidas aos mesmos tratamentos. Entretanto, dentro de uma mesma linhagem (WT vs. WT ou IL-12p40KO vs. IL-12p40KO), o pré-tratamento com 4 pg/mL de rIFN- γ estimulou as células infectadas a produzirem mais NO_2^- em comparação àquelas não tratadas com rIFN- γ .

4 Discussão

Há mais de 100 anos Carlos Chagas descreveu uma nova tripanossomíase americana (Chagas, 1909), causada pelo *T. cruzi* e posteriormente denominada doença de Chagas. Nesse mesmo estudo, Chagas reportou perturbações do sistema nervoso em crianças, caracterizadas na maioria das vezes por condição intelectual precária, agitação e delírios (Chagas, 1909). Durante décadas, muitos estudos foram realizados visando à melhor compreensão e tratamento das formas cardíaca e digestiva da doença, enquanto que a afecção do sistema nervoso permaneceu pouco explorada. Contudo, em vista da crescente sobreposição da infecção pelo *T. cruzi* e da imunossupressão induzida em pacientes transplantados, ou causada pelo HIV, casos de reativação da doença de Chagas no SNC começaram a ser relatados (Leiguarda et al., 1990; Rosemberg et al., 1992; Jardim e Takayanagui, 1994; Rocha et al., 1994; Marchiori et al., 2007; Cordova et al., 2008).

A infecção de camundongos IL-12p40KO por parasitas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi* consiste em um bom modelo experimental para o estudo da forma nervosa da doença de Chagas. A cepa Sylvio X10/4 é conhecida por sua baixa virulência, não causando parasitemia patente e possibilitando que o camundongo atinja a fase crônica da doença (Marinho et al., 2009). Quando infectados com esses parasitas, os camundongos IL-12p40KO desenvolvem uma paralisia ascendente, da cauda aos membros anteriores, culminante em morte (Marinho et al., 2007; Bombeiro et al., 2010). Esses camundongos não produzem IL-12 e nem IL-23, pois a subunidade IL-12p40 compartilhada por ambas as interleucinas não é funcional. Desse modo, devido à ausência de IL-12 eles falham em montar uma resposta TH1 completa, crucial para o controle eficiente do *T. cruzi* (Michailowsky et al., 2001; Marinho et al., 2007). Além do mais, na falta de IL-23 eles não mantêm a população de linfócitos TH17 (Bettelli et al., 2006), produtores da citocina pró-inflamatória IL-17, a qual possui atividade protetora na fase aguda da doença de Chagas (Da Matta Guedes et al., 2010; Miyazaki et al., 2010).

A incapacidade dos camundongos IL-12p40KO em conter a colonização da medula espinal pelo *T. cruzi* (Bombeiro et al., 2010) parece estar majoritariamente relacionada a uma falha local na eliminação do protozoário, do que à re-invasão do tecido nervoso em decorrência de um grande número de parasitas circulantes, oriundos de outros órgãos ou tecidos. Essa hipótese é fortalecida pelo fato de que aos 14 dias após a infecção, os camundongos IL-12p40KO apresentaram um nível de parasitismo na medula espinal tão elevado quanto ao máximo observado nos indivíduos WT ao longo de todo o decurso experimental, sendo que naquele mesmo período, os níveis de parasitemia e de parasitismo

cardíaco apresentados pelos animais imunodeprimidos foram praticamente nulos. Contrariamente aos camundongos IL-12p40KO, os indivíduos WT foram capazes de controlar a colonização da medula espinal de forma bem sucedida, pois não apresentaram danos motores decorrentes da infecção pelo *T. cruzi*, sendo que a carga parasitária local decaiu aproximadamente cem vezes da quinta à sétima semana após a infecção.

Com a presença do *T. cruzi* na medula espinal, era de se esperar a ocorrência de um processo inflamatório local. Se por um lado a inflamação é benéfica por restabelecer a homeostase tecidual após injúrias, por outro, torna-se prejudicial frente à persistência do estímulo antigênico e subsequente produção de substâncias que, acumuladas, tornam-se citotóxicas. Nesse contexto, foi demonstrado que níveis elevados de TNF α e óxido nítrico prejudicam a captação do glutamato pelos astrócitos (Chao e Hu, 1994; Bal-Price et al., 2002), contribuindo com a desmielinização (Matute et al., 1997; Merrill e Scolding, 1999; Dewar et al., 2003; Domercq et al., 2007) e intensificando os processos neurodegenerativos. De acordo com os nossos resultados, a inflamação e o parasitismo na medula espinal evoluíram paralelamente tanto nos camundongos WT quanto nos IL-12p40KO. Entretanto, ao passo que os indivíduos WT foram capazes de conter a infecção e, por conseguinte, diminuir a carga de mediadores pró-inflamatórios, os animais IL-12p40KO apresentaram uma taxa de parasitismo ascendente, acompanhada por uma intensa inflamação local. Curiosamente, as curvas dos transcritos para TNF α , CD3, IFN- γ e iNOS das duas linhagens de camundongos se intersectaram imediatamente após a quarta semana de infecção, coincidente o surgimento de danos motores nos camundongos IL-12p40KO. Tal fato sugere que a inflamação exacerbada apresentada pelos animais imunodeficientes a partir daquele momento possa estar estritamente relacionada ao desenvolvimento do processo neurodegenerativo (Bombeiro et al., 2010).

Embora a IL-10 exerça atividade anti-inflamatória e seja um potente inibidor da resposta TH1 (Opal e Depalo, 2000), observamos que a cinética de transcrição gênica dessa interleucina na medula espinal dos animais IL-12p40KO foi similar àquela apresentada pelas citocinas pró-inflamatórias. É importante ressaltar, entretanto, que a ocorrência de uma resposta inflamatória intensa no tecido imunodeficiente, acompanhada pela produção ascendente de IL-10 não indica, em hipótese alguma, que houve uma falha na modulação da resposta imune. Pelo contrário, podemos supor que ocorreu um balanço entre a indução e a inibição da inflamação, pois caso houvesse menos IL-10, poderíamos encontrar maiores danos teciduais em decorrência de uma inflamação exacerbada. Do oposto, ou seja, na presença do excesso de IL-10, teríamos uma resposta imune enfraquecida, acompanhada de maior

parasitismo (Abrahamsohn e Coffman, 1996). Em vista disso, acreditamos que a produção de IL-10 na medula IL-12p40KO tenha amenizado os afeitos indesejáveis da inflamação, contudo, em vista da persistência do estímulo antigênico, não conseguiu silenciar a resposta inflamatória.

Dentre os mediadores pró-inflamatórios liberados durante a infecção pelo *T. cruzi*, o IFN- γ tem-se demonstrado crucial no controle da disseminação do parasita (Michailowsky et al., 2001; Marinho et al., 2007). Sua importância é destacada pelo fato de que camundongos privados de IFN- γ apresentam elevadas taxas de parasitemia e mortalidade no início da infecção, acompanhadas por lesões cardíacas e pela falta de IgG2a específica ao *T. cruzi* (Abrahamsohn e Coffman, 1996; Marinho et al., 2007). De acordo com os nossos dados, não apenas os camundongos WT sintetizaram mRNA de IFN- γ na medula espinal em todos os tempos analisados, como também os animais deficientes em IL-12. Embora a IL-12 seja importante para a polarização TH1, a síntese de IFN- γ não depende exclusivamente dela. Nesse contexto, foi demonstrado que a produção de IFN- γ torna-se elevada quando a IL-18 atua em sinergismo com a IL-12 (Dinarello, 1999). Não obstante, Muller e colaboradores (Muller et al., 2001) relataram que os linfócitos T CD4⁺ de camundongos IL-12p35KO infectados com *T. cruzi* são capazes de produzir IFN- γ de forma dependente de IL-18. Em vista disso, acreditamos que a produção de IL-18 por astrócitos e microglias (Conti et al., 1999; Prinz e Hanisch, 1999) possa ter favorecido a transcrição gênica do IFN- γ na medula espinal dos camundongos IL-12p40KO.

Um fato que nos chamou a atenção foi a incapacidade dos camundongos IL-12p40KO em controlar o parasitismo na medula espinal na fase mais tardia da infecção pelo *T. cruzi*, quando os níveis transcricionais e protéicos de IFN- γ e da sintase de óxido nítrico estavam notavelmente elevados (Bombeiro et al., 2010; vide Capítulo II). Além do mais, um terço de todas as microglias e macrófagos infiltrantes na medula espinal estava parasitado (vide Capítulo II). A princípio, imaginamos que as microglias dos camundongos IL-12p40KO poderiam estar se comportando como os macrófagos peritoneais dessa linhagem, os quais apresentam capacidade prejudicada em eliminar as formas intracelulares de *T. cruzi* (Bastos et al., 2002). Contrariamente ao que esperávamos, não constatamos qualquer diferença na taxa de infectividade das microglias WT e IL-12p40KO submetidas aos mesmos tratamentos com rIFN- γ , exceto pela administração de 4 pg/mL de rIFN- γ , quando a infecção das microglias IL-12p40KO foi reduzida pela metade. Congruente com esses dados, também não observamos diferenças na produção de óxido nítrico entre as duas culturas submetidas aos mesmos tratamentos. As razões pelas quais as microglias WT e IL-12p40KO apresentaram a mesma

permissividade ao *T. cruzi* permanecem desconhecidas. Entretanto, supomos que no caso da infecção *in vivo*, a incapacidade das microglias IL-12p40KO em eliminar o parasita possa estar relacionada a um déficit no *priming* dessas células. Nesse processo, o IFN- γ produzido localmente ou sistemicamente atua sobre os fagócitos antes que eles entrem em contato com o patógeno, elevando o seu estado de reatividade. Assim, frente a um microrganismo, as células primadas demonstram maior eficiência na sua eliminação (Franklin et al., 2009). No caso dos camundongos IL-12p40KO, o *priming* deficiente dos macrófagos/microglias poderia ser decorrente de baixos níveis basais de IFN- γ (Tessema et al., 2009). Outra hipótese para explicar a colonização da medula espinal dos camundongos IL-12p40KO pelo *T. cruzi* consiste em uma resposta imune TH1 branda no início da infecção. Nesse contexto, a baixa produção inicial de IFN- γ decorrente da falta do estímulo da IL-12 poderia favorecer a proliferação do parasita de forma exponencial e jamais controlada. De acordo com os nossos dados, os camundongos WT apresentaram um nível ótimo de transcrição do IFN- γ na terceira semana após a infecção, quando o parasitismo na medula espinal estava estabilizado. Entretanto, nesse mesmo período, a síntese de mRNA para o IFN- γ foi muito inferior no grupo IL-12p40KO, equiparando-se àquela dos animais WT somente a partir da quarta semana após a infecção, quando o parasitismo já era muito alto.

Em vista do exposto, consideramos que um atraso na produção inicial de IFN- γ pelos camundongos IL-12p40KO infectados com *T. cruzi* seja responsável pela ativação tardia ou ineficiente dos fagócitos da medula espinal, favorecendo, assim, a disseminação descontrolada do protozoário pelo tecido nervoso.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Dra. Sanae Kasahara (Univesidade Estadual Paulista, Brazil) pelo auxílio na aquisição de imagens, ao Rogério Silva do Nascimento, à Dra. Meire Hiyane, à Thereza Florence Dinucci e ao Bernardo Paulo Albe pelo suporte técnico. Auxílio financeiro provido pela FAPESP e CNPq.

VI CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há mais de um século, Carlos Chagas deu início a uma série de estudos pioneiros na história da medicina tropical brasileira, com a descoberta de uma nova tripanossomíase americana. Em pouco tempo, Chagas descreveu a etiologia, a epidemiologia, os sintomas e os sinais clínicos e, até mesmo, o impacto social dessa nova moléstia. Mesmo muitos anos após a descoberta e a descrição da doença de Chagas, acompanhados dos grandes progressos alcançados ao longo das últimas décadas, vários aspectos da doença ainda permanecem obscuros, principalmente no que se refere à patogênese e aos eventos imunológicos desencadeados durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Neste sentido, a forma nervosa da doença de Chagas, cujos danos ao hospedeiro humano podem ser irreversíveis, também permanece muito pouco explorada sob vários aspectos clínicos e experimentais.

Considerando tais fatos, iniciamos estudos neuroimunológicos da doença de Chagas experimental, a partir de análises histomoleculares da medula espinal de camundongos imunocompetentes e imunodeficientes (IL-12p40KO) infectados com parasitas da cepa Sylvio X10/4 de *T. cruzi*. Assim sendo, trabalhamos na caracterização do processo patogênico no ponto mais tardio da infecção, no qual destacamos a elevada presença do parasita no tecido do animal deficiente, acompanhada por um processo inflamatório proeminente, pela produção exacerbada de substâncias potencialmente citotóxicas e morte neuronal. Outro ponto importante a ser destacado é o estudo da cinética de infecção e de inflamação na medula espinal, no qual sugerimos que a produção local tardia de IFN- γ pelos animais IL-12p40KO seja o principal fator responsável pela ineficiência do controle da disseminação do parasita.

Levando-se em conta que ainda há poucos estudos relacionados à forma nervosa da doença de Chagas, acreditamos que o presente trabalho possa oferecer novas perspectivas quanto ao entendimento de como as desordens neurológicas são desencadeadas durante a infecção pelo *T. cruzi*. Contudo, cabe ressaltar que é indispensável a realização de novos estudos com metodologias cada vez mais avançadas afim de se aumentar o grau de conhecimento sobre essa forma da doença.

REFERÊNCIAS*

- Abrahamsohn, IA, Coffman, RL. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*, 1996; 84:231-44.
- Aliberti, JC et al. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*, 1996; 64:1961-7.
- Aliberti, JC et al. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi. *Infect Immun*, 1999; 67:4819-26.
- Almeida-Leite, CM et al. Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. *Neurobiol Dis*, 2007; 25: 170-8.
- Almeida, EA et al. Chagas' disease and HIV co-infection in patients without effective antiretroviral therapy: prevalence, clinical presentation and natural history. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2010; 104:447-52.
- Aloisi, F. Immune function of microglia. *Glia*, 2001; 36:165-79.
- Andrade, LO et al. Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*, 1999; 100: 163-72.
- Andrade, MS et al. Contuse lesion of the rat spinal cord of moderate intensity leads to a higher time-dependent secondary neurodegeneration than severe one. An open-window for experimental neuroprotective interventions. *Tissue Cell*, 2008; 40:143-56
- Andrade, MS et al. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration. *Brain Res*, 2010 (CHECAR); 1346:266-78.
- Andrade, SG. Influence of Trypanosoma cruzi strain on the pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1990; 85:17-27.
- Arantes, RM et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in Trypanosoma cruzi-infected mice. *Am J Pathol*, 2004; 164:1361-8.
- Araujo, FG. Development of resistance to Trypanosoma cruzi in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect Immun*, 1989; 57:2246-8.
- Bal-Price et al. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. *Glia*, 2002; 40:312-23.
- Bao, F, Liu, D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience*, 2002; 115:839-49.

---

* De acordo com International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>

Barkhuizen, M, Magez, S, et al. Interleukin-12p70-dependent interferon- gamma production is crucial for resistance in African trypanosomiasis. *J Infect Dis*, 2007; 196:1253-60.

_____. Interleukin-12p70 deficiency increases survival and diminishes pathology in *Trypanosoma congolense* infection. *J Infect Dis*, 2008; 198:1284-91.

Bastos, KR et al. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *J Leukoc Biol*, 2002; 71:271-8. 2002.

Bastos, KR et al. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect*, 2004; 6:630-6

Becher, B et al. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest*, 2002; 110:493-7.

Benitez-Hernandez, I et al. Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology*, 2010; 215:413-26.

Bettelli, E et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006; 441:235-8.

Bishop, A, Anderson, JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*, 2005; 208:193-205.

Bombeiro, AL et al. Neurodegeneration and increased production of nitrotyrosine, nitric oxide synthase, IFN-gamma and S100beta protein in the spinal cord of IL-12p40-deficient mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Neuroimmunomodulation*, 2010; 17:67-78.

Brask, J et al. Exposure to interferon-gamma during synaptogenesis increases inhibitory activity after a latent period in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, 2004; 19:3193-201.

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1962; 4:389-96.

Brener, Z, Andrade, ZA. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 6-10.

Brener, Z, Gazzinelli, RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997; 114:103-10.

Brown, GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35:1119-21.

Bsibsi, M et al. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002; 61:1013-21.

Cabrera, G et al. DNA repair pathway inhibition increases cell death caused by oxidative DNA damage in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem*, in press.

Cardillo, F et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*, 1996; 64:128-34.

Cardoso, RAA. Lesões do sistema nervoso central em 4 casos infantis agudos de doença de Chagas. *Bol Inst Puer Univ Brasil*, 1960; 17:101-10.

Carpentier, PA et al. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, 2005; 49:360-74.

Chadi, G et al., Experimental models of partial lesion of rat spinal cord to investigate neurodegeneration, glial activation, and behavior impairments. *Int J Neurosci*, 2001; 111:137-65.

Chadi, G, Gomide, VC. FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Cell Biol Int*, 2004; 28:849-61.

Chadi, G et al. Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res*, 1993; 97:145-58.

Chadi, G et al. Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. *Neuroreport*, 1993b, 4:783-6.

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

_____. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1911; 3: 219-275.

Chan, SH et al. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol*, 1992; 148:92-8.

Chan, SH et al. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med*, 1991; 173:869-79.

Chao, CC, Hu, S. Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev Neurosci*, 1994; 16:172-9.

Cobb, D et al. T-bet-dependent regulation of CD8+ T-cell expansion during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 2009; 128:589-99.

Conti, B et al. Cultures of astrocytes and microglia express interleukin 18. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999; 67:46-52.

- Cordova, E et al. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007. *Int J Infect Dis*, 2008; 12:587-92.
- Cummings, KL, Tarleton, RL. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*, 2004; 72: 4081-9.
- Da Matta Guedes, PM et al., IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010; 4:e604.
- Damsker, JM et al. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*, 2010; 1183:211-21.
- De Oliveira, L et al. Nitric oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Calomys callosus* and Swiss mice. *Parasitol Res*, 1997; 83:762-70.
- Dewar, D et al. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003; 23:263-74.
- Diazgranados, CA et al., Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. *Lancet Infect Dis*, 2009; 9: 324-30.
- Dimmeler, S, Zeiher, AM. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ*, 1999; 6: 964-8.
- Dinarello, CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*, 1999; 103:11-24.
- Domercq, M et al. System xc- and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *J Immunol*, 2007; 178:6549-56.
- Dong, Y, Benveniste, EN. Immune function of astrocytes. *Glia*, 2001; 36:180-90.
- Eizenberg, O et al. Direct involvement of p53 in programmed cell death of oligodendrocytes. *Embo J*, 1995; 14:1136-44.
- Erdmann, H et al. Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell Microbiol*, 2009; 11:1600-1611.
- Foran, E, Trotti, D. Glutamate Transporters and the Excitotoxic Path to Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 2009; 11:1-16.
- Franklin, BS et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106:5789-94.
- Galvao Da Silva, AP et al. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immunology*, 2003; 108: 230-7.

Garcia, SB et al. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*, 1999; 93:191-7.

Gazzinelli, RT et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*, 1992; 22:2501-6.

Giulietti, A et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 2001; 25:386-401.

Golden, JM, Tarleton, RL. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol*, 1991; 72:391-402.

Good, PF et al. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998; 57:338-42.

Gundersen, HJ et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, 1988; 96:379-94.

Hendriks, JJ et al. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005; 48:185-95.

Higuchi, M et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol*, 1993; 2:101-106.

Hisahara, S et al. ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J Neurochem*, 1997; 69:10-20.

Hoff, R et al. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N Engl J Med*, 1978a; 298:604-6.

_____. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N Engl J Med*, 1978b; 298:604-6.

Holscher, C et al. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*, 1998; 66 :1208-15.

Hontebeyrie-Joskowicz, M, Minoprio, P. Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* vs. the host immune system. *Res Immunol*, 1991; 142:125-6.

Hotez, PJ et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*, 2007; 357:1018-27.

Hu, J, Castets, F, et al. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem*, 1996; 271:2543-7.

Hu, J et al., S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*, 1997; 69:2294-301.

Huang, W et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis*, 2004; 190:624-31.

Hyun, DH et al. Effect of wild-type or mutant Parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome. *J Biol Chem*, 2002, 277:28572-7. 2002.

Ischiropoulos, H, Beckman, JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest*, 2003; 111:163-9.

Jardim, E, Takayanagui, OM. Chagasic meningoencephalitis with detection of *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid of an immunodepressed patient. *J Trop Med Hyg*, 1994; 97:367-70.

Junqueira, C et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*, 2010; 12:e29.

Kim, IJ et al. Interferon gamma induces retrograde dendritic retraction and inhibits synapse formation. *J Neurosci*, 2002, 22:4530-9.

Kim, PK et al. Regulation of caspases by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 962:42-52.

Kirchhoff, LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin North Am*, 1996; 25:517-33.

Korn, T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol*, 2008; 255:2-6.

Kramer, JM, Gaffen, SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol*, 2007; 78:1083-93.

Langrish, CL et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 2005; 201:233-40.

Leiguarda, R et al. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) in immunosuppressed patients. *Neurology*, 1990; 40:850-1.

Lescure, FX et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis*, 2010; 10:556-70.

Lieberman, LA et al. IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12. *J Immunol*, 2004; 173:1887-93.

Linares, D et al. Neuronal nitric oxide synthase plays a key role in CNS demyelination. *J Neurosci*, 2006; 26:12672-81.

Lovchik, JA et al. A role for gamma interferon-induced nitric oxide in pulmonary clearance of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995; 13:116-24.

- Machado, FS et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, 2000; 102:3003-8.
- Mantovani, A et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004; 25:677-86.
- Marchiori, PE et al. Late reactivation of Chagas' disease presenting in a recipient as an expansive mass lesion in the brain after heart transplantation of chagasic cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant*, 2007; 26:1091-6.
- Marinho, CR et al. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a Trypanosoma cruzi clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infect Immun*, 2004; 72:2350-7.
- Marinho, CR et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*, 1999; 67:308-18.
- Marinho, CR et al. Infection by the Sylvio X10/4 clone of Trypanosoma cruzi: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. *Microbes Infect*, 2009; 11:1037-45.
- _____. IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 Trypanosoma cruzi parasites. *Scand J Immunol*, 2007; 66:297-308.
- Matute, C et al. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94:8830-5.
- Mctigue, DM, Tripathi, RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem*, 2008; 107:1-19.
- Merrill, JE, Scolding, NJ. Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1999; 25:435-58.
- Meyer Zum Buschenfelde, C et al. Trypanosoma cruzi induces strong IL-12 and IL-18 gene expression in vivo: correlation with interferon-gamma (IFN-gamma) production. *Clin Exp Immunol*, 1997; 110:378-85.
- Michailowsky, V et al. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of Trypanosoma cruzi. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998; 42:2549-56.
- Michailowsky, V et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection. *Am J Pathol*, 2001; 159:1723-33.
- Miles, MA. Letter: Cloning Trypanosoma cruzi. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1974; 68:256.

Miyazaki, Y et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 2010; 185:1150-7.

Mizuno, T et al. Interferon-gamma directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor. *Faseb J*, 2008; 22:1797-806.

Morel, CM, Lazdins, J. Chagas disease. *Nat Rev Microbiol*, 2003; 1:14-5.

Muller, U et al. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol*, 2001; 167:3346-53.

Nakanishi, K et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*, 2001; 19:423-74.

Neumann, H et al. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95:5779-84.

Nimmerjahn, A, Kirchhoff, F, et al. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 2005; 308:1314-8.

Oddo, D et al. Acute Chagas' disease (Trypanosomiasis americana) in acquired immunodeficiency syndrome: report of two cases. *Hum Pathol*, 1992; 23:41-4.

Opal, SM, Depalo, VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 2000; 117:1162-72.

Oppmann, B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 2000; 13: 715-25.

Petray, P et al. Role of nitric oxide in resistance and histopathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Lett*, 1995; 47:121-6.

Petray, P et al. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*, 1994; 16:193-9.

Peudenier, S et al. HIV receptors within the brain: a study of CD4 and MHC-II on human neurons, astrocytes and microglial cells. *Res Virol*, 1991; 142:145-9.

Pittella, JE. Central nervous system involvement in experimental Trypanosomiasis cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1991; 86:141-5.

_____. Central nervous system involvement in Chagas' disease. An updating. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1993; 35:111-6.

Postan, M et al. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN- mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg*, 1983; 32:497-506.

Postan, M, et al. Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987; 81:415-9.

Prinz, M, Hanisch, UK. Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J Neurochem*, 1999; 72:2215-8.

Rachid, MA et al. Role of endothelin receptors in the control of central nervous system parasitism in *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *J Neuroimmunol*, 2010, 220: 64-68.

Rassi, A,Jr et al. Chagas disease. *Lancet*, 2010; 375:1388-402.

Rivlin, AS, Tator, CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg*, 1977; 47:577-81.

Rocha, A et al. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, 1994; 50:261-8.

Rodriguez, AM et al. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect Immun*, 1981; 31:524-9.

Rosemberg, S et al. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*, 1992; 42:640-2.

Rothwell, N et al. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest*, 1997; 100:2648-52.

Rottenberg, ME et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*, 1993; 61:5129-33.

Rottenberg, ME et al. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*, 1995; 41:164-70.

Russo, M et al. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. *Ann Inst Pasteur Immunol*, 1988; 139:225-36.

Saeftel, M et al. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*, 2001; 69:2252-9.

Santiago, HC et al. Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J Immunol*, 2005; 175:8165-72.

Sardinha, LR et al. Contribution of NK, NK T, gammadelta T, and alphabeta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 2006; 74:2031-42.

Sartori, AM et al. Exacerbation of HIV viral load simultaneous with asymptomatic reactivation of chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 2002a; 67:521-3.

Sartori, AM et al. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *J Infect Dis*, 2002b; 186:872-5.

Shibata, N, Kobayashi, M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve*, 2008; 60:157-70.

Silva, JS et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 31:111-5.

Silva, TP et al. Effects of ethanol consumption on vasopressin and neuropeptide Y immunoreactivity and mRNA expression in peripheral and central areas related to cardiovascular regulation. *Alcohol*, 2004; 32:213-22.

Silveira, F et al. Nono caso autóctone de doença de Chagas registrado no estado do Pará, Brasil (Nota prévia). *Hileia Medica*, 1979; 1: 61-62.

Tabner, BJ et al. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A(beta) and alpha-synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 2002; 32:1076-83.

Tan, ZY et al. Interleukin-23: immunological roles and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009; 41:733-5.

Tanowitz, HB et al. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*, 1992; 5:400-19..

Tarleton, RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 1990; 144: 717-24.

_____. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*, 2007; 19:430-4.

Tarleton, RL et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun*, 1994; 62:1820-9.

Tessema, TS et al. Dynamics of gut mucosal and systemic Th1/Th2 cytokine responses in interferon-gamma and interleukin-12p40 knock out mice during primary and challenge *Cryptosporidium parvum* infection. *Immunobiology*, 2009; 214:454-66.

Thery, C et al. Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing. *Eur J Neurosci*, 1991; 3:1155-1164.

Tilleux, S, Hermans, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *J Neurosci Res*, 2007; 85:2059-70.

Trischmann, T et al. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp Parasitol*, 1978; 45:160-8.

- Umemura, M et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*, 2007; 178:3786-96.
- Vago, AR et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*, 2000; 156:1805-9.
- Vago, AR et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 1996; 348:891-2.
- Veldhoen, M et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006; 24:179-89.
- Vespa, GN et al. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*, 1994; 11:5177-82.
- Vikman, KS et al. Interferon-gamma-induced changes in synaptic activity and AMPA receptor clustering in hippocampal cultures. *Brain Res*, 2001; 896:18-29.
- Villalta, F et al. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun*, 1998; 66:4690-5.
- Way, SS et al. IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 2007; 178:4498-505.
- West, MJ, Gundersen, HJ. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*, 1990; 296:1-22.
- WHO. Control of Chagas disease, 2002; 905: i-vi, 1-109, back cover p. (World Health Organ Tech Rep Ser)
- Wong, G et al. Interferon-gamma but not TNF alpha promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. *Exp Neurol*, 2004; 187:171-7.
- Xie, QW, Nathan, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Trans Assoc Am Physicians*, 1993; 106:1-12.
- Xiong, H et al. Mutual regulation between the intercellular messengers nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor in rodent neocortical neurons. *Eur J Neurosci*, 1999; 11:1567-76.

Original Paper

NeuroImmunoModulation

Neuroimmunomodulation 2010;17:67–78
DOI: 10.1159/000258689Received: February 20, 2009
Accepted after revision: May 13, 2009
Published online: November 17, 2009

Neurodegeneration and Increased Production of Nitrotyrosine, Nitric Oxide Synthase, IFN- γ and S100 β Protein in the Spinal Cord of IL-12p40-Deficient Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*

André Luis Bombeiro^{a, b} Maria Regina D'Império Lima^a Gerson Chadi^b
José Maria Álvarez^a^aDepartment of Immunology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo and ^bDepartment of Neurology, Neuroregeneration Center, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil**Key Words***Trypanosoma cruzi* · Central nervous system · Nitric oxide · IL-12 · S100 β · IFN- γ **Abstract**

Background/Aim: Chagas' disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and occurs in most Latin American countries. The protozoan may colonize the central nervous system (CNS) of immune-compromised human hosts, thus causing neuronal disorders. Systemic control of the intracellular forms of the parasite greatly depends on the establishment of a TH1 response and subsequent nitric oxide (NO) release. At the CNS, it is known that low concentrations of NO promote neuronal survival and growth, while high concentrations exert toxic effects and neuron death. Accounting for NO production by astrocytes is the glia-derived factor S100 β , which is overproduced in some neurodegenerative diseases. In the current work, we studied the expression of NO, interferon (IFN)- γ and S100 β in the spinal cord tissue of IL-12p40KO mice infected with *T. cruzi*, a model of neurodegenerative process.

Methods: IL-12p40KO and wild-type (WT) female mice in-

fectured with *T. cruzi* Sylvio X10/4 (10^5 trypomastigotes, intraperitoneally) were euthanized when IL-12p40KO individuals presented limb paralysis. Spinal cord sections were submitted to immunohistochemical procedures for localization of neurofilament, laminin, nitrotyrosine, NO synthases (NOS), IFN- γ and S100 β . The total number of neurons was estimated by stereological analysis and the area and intensity of immunoreactivities were assessed by microdensitometric/morphometric image analysis. **Results:** No lesion was found in the spinal cord sections of WT mice, while morphological disarrangements, many inflammatory foci, enlarged vessels, amastigote nests and dying neurons were seen at various levels of IL-12p40KO spinal cord. Compared to WT mice, IL-12p40KO mice presented a decrement on total number of neurons (46.4%, $p < 0.05$) and showed increased values of immunoreactive area for nitrotyrosine (239%, $p < 0.01$) and NOS (544%, $p < 0.001$). Moreover, the intensity of nitrotyrosine (16%, $p < 0.01$), NOS (38%, $p < 0.05$) and S100 β (21%, $p < 0.001$) immunoreactivities were also augmented. No IFN- γ -labeled cells were seen in WT spinal cord tissue, contrary to IL-12p40KO tissue that displayed inflammatory infiltrating cells and also some parenchymal cells positively labeled.

© 2009 S. Karger AG, Basel
1021-7401/10/0172-0067\$26.00/0Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.comAccessible online at:
www.karger.com/nimAndré Luis Bombeiro
Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 1730
São Paulo, SP 05508-000 (Brazil)
Tel. +55 11 3091 7389, Fax +55 11 3091 7224, E-Mail andrelb@icb.usp.br