

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

EFEITOS DA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE OS COMPONENTES LINFÓIDE E MICROAMBIENTAL DO TIMO: RELAÇÃO COM INTERAÇÃO TIMÓCITO-EPITÉLIO TÍMICO E MORTE CELULAR.

Désio Aurélio Farias de Oliveira

Orientador (es): Profa. Dra. Juliana de Meis
Profa. Dra. Déa Maria Serra Villa-Verde

RIO DE JANEIRO

2011

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

O48 Oliveira, Désio Aurélio Farias de

Efeitos da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* sobre os componentes linfóide e microambiental do timo: relação com interação timócito-epitélio tímico e morte celular / Désio Aurélio Farias de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2011.

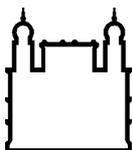
xvii, 186 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

Bibliografia: f. 151-185

1. Doença de Chagas. 2. Timo. 3. Matriz extracelular. 4. Caspases. 5. Apoptose. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Désio Aurélio Farias de Oliveira

EFEITOS DA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE OS COMPONENTES LINFÓIDE E MICROAMBIENTAL DO TIMO: RELAÇÃO COM INTERAÇÃO TIMÓCITO-EPITÉLIO TÍMICO E MORTE CELULAR.

ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Juliana de Meis

Profa. Dra. Déa Maria Serra Villa-Verde

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Andréa Henriques Pons

Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima

Prof. Dr. Marcello A. Barcinski

Profa. Dra. Marise Pinheiro Nunes (Revisor/Suplente)

Profa. Dra. Daniella Arêas Mendes da Cruz (Suplente)

Rio de Janeiro, 15 de Dezembro de 2011.

Ao meu Deus que sempre me mostrou o melhor caminho.

As minhas Orientadoras Juliana de Meis e Déa Maria S. Villa-Verde, por tudo que cada uma individualmente fez durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelo comprometimento, por todas as críticas, e por tantas oportunidades de participação em eventos científicos. Não poderia esquecer do companheirismo, paciência e afeto. Foram dias maravilhosos, inesquecíveis, nossa convivência nos trouxe grandes ensinamentos. “Juju você não conseguiu colorir meu caderno”.

Aos meus pais Aureliano e Edna, por me propiciarem uma vida digna, onde eu pudesse crescer acreditando na honestidade, integridade de caráter e convicção de que alcançar as metas depende de nossa vontade e de nossa superação.

Dayse minha irmã querida, você me ajudou muito e também faz parte de tudo isso...obrigado por tudo.

Manolão, Carminha e Tininho, minha família adquirida, pessoas mais que especiais. Obrigado outra vez pelas incansáveis demonstrações de carinho e companheirismo.

Savino, além de um grande amigo, você é minha referência acadêmica. Obrigado por todas as críticas e sugestões, pela liberdade que nos permite criar, por estar ao nosso lado em todos os momentos.

Ao meu amigo Vinícius (Dr Cottinha) pelas importantes dicas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Marize Pinheiro Nunes, agradeço a relevante revisão deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório, Ingo (o “organizado”), Daniela (“Ingo...estou te esperando...”), Fernandinha (ternurinha), Dumith (“dá-lhe garoto...indivíduo competente!”), Eliane (Gisele little black Bündchen), Leandra (“...é acho que vai dar tudo certo...”), Marcelo Daniel (o estatístico) e Victor (o bafudo). Agradeço as valiosas dicas, cumplicidade e união. Nosso cotidiano é maravilhoso, pois além da grande amizade, temos a clareza do respeito mútuo.

Ao Luiz Berbert (o caçador do urso azul), Cíntia Palú (como você é paciente...), Pedro Henrique (sorriso) e Juliana Barreto (malinha, candidata a container), vocês foram fundamentais, não posso esquecer das valiosas ajudas, muito obrigado.

Ao grupo que promete, Carolsinha (volta p`ra casa...), Daiani (“vixe Maria!”), Ariani (risadinha), Ailin (“tipo assim...”), Jéssica, Camila, Jairo (grilo falante), Larissa, Júlia, Bruno, Pedro (o jogado), Ednéia, Danielma, Elaine e Daniele (“oxente bichinha!”), agradeço por compreenderem minha maneira de ser. A vocês, para reflexão, fica o pensamento de Samuel Longhorne Clemens “Nunca se afaste de seus sonhos. Porque se eles forem, você continuará vivendo, mas terá deixado de existir”.

Aos que tornam a vida no laboratório mais funcional: Celso, Sidnéia, Marina, Valmir, Elaine, Verônica e Daniele. Vocês são fundamentais ao nosso trabalho, obrigado por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente, desejam o meu sucesso.

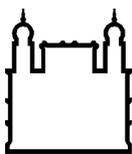
DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus amores,
Maria Laura minha mulher e nosso filho Guilherme.

Assim como o oceano, só é belo com o luar
Assim como a canção, só tem razão se se cantar
Assim como uma nuvem, só acontece se chover
Assim como o poeta, só é bem grande se sofrer
Assim como viver sem ter amor, não é viver
Não há vocês sem mim
E eu não existo sem vocês!

(Adaptado de Vinícius de Moraes)

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisas sobre o timo do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Juliana de Meis e da Dra. Déa Maria Serra Villa Verde. Contamos com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITOS DA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE OS COMPONENTES LINFÓIDE E MICROAMBIENTAL DO TIMO: RELAÇÃO COM INTERAÇÃO TIMÓCITO-EPITÉLIO TÍMICO E MORTE CELULAR.

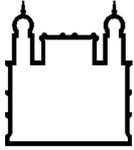
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Désio Aurélio Farias de Oliveira

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* promove alterações em órgãos linfóides. O timo apresenta-se atrofiado com depleção de células CD4⁺CD8⁺ (DP) na fase aguda. Em órgãos linfóides periféricos, os linfonodos subcutâneos (LSC) e o baço apresentam-se hipertrofiados com aumento de células T e B, enquanto os linfonodos mesentéricos (LM) apresentam-se atrofiados devido à morte dessas células. Nesse trabalho estudamos os efeitos da infecção pelo *T. cruzi* sobre células epiteliais tímicas (TEC) e timócitos, bem como o papel do timo no comportamento de órgãos linfóides periféricos. Em experimentos de infecção *in vitro*, avaliamos TEC, abordando a expressão de ligantes e receptores da matriz extracelular (ECM), e ainda, as possíveis conseqüências desse aumento de ECM sobre a interação de TEC/timócitos ou TEC/parasita. Nossos resultados demonstram que a infecção promove diminuição do número de TEC, alterações morfológicas e aumento de ECM em culturas infectadas. Observamos também que componentes da ECM são requeridos na interação entre TEC/parasita. Curiosamente, o menor crescimento de TEC em culturas infectadas está associada com a inibição do ciclo celular e não com apoptose. No que se refere à interação TEC/timócitos, observamos que a adesão foi maior nas culturas infectadas, especialmente sobre TEC parasitadas. Esse aumento de adesão entre TEC/timócitos corrobora a hipótese descrita anteriormente pelo nosso grupo que a infecção favorece a migração de timócitos para periferia. Estendendo nossa análise ao compartimento linfóide do timo, investigamos a apoptose de timócitos na infecção. Observamos que a celularidade do timo diminui

durante a infecção, juntamente com aumento de apoptose de timócitos CD4⁺CD8⁻ (DN), DP, CD4 e CD8. Procurando entender a via envolvida na apoptose desses timócitos, demonstramos que a atividade de caspases total, caspase 8, caspase 9 e caspase 3 estão aumentadas na infecção. Observamos que ambas caspases iniciadoras caspase 8 (via extrínseca, Fas, TNF, TRAIL) e caspase 9 (via intrínseca, privação de fatores) parecem estar envolvidas na depleção desses timócitos. Esse dado foi confirmado nos experimentos de bloqueio de morte com inibidores de caspases, onde observamos que o tratamento *in vivo* (injeção intratímica) e *in vitro* com zVAD (inibidor geral de caspases) em timócitos de animais infectados foi mais eficaz no bloqueio da morte do que os inibidores de caspase-8 (zIETD) ou caspase-9 (zLEHD). Além disso, animais infectados e tratados com zVAD apresentaram a celularidade do timo parcialmente recuperada, mais especificamente em timócitos DN e DP. Finalmente, procurando entender o papel do timo na resposta imune regional de órgãos linfóides periféricos na infecção, camundongos foram timectomizados antes da infecção para avaliação da celularidade dos LSC, LM e baço. Nossos dados demonstram que, mesmo com a ausência do timo, a hipertrofia dos LSC e a atrofia dos LM permaneciam inalterados, entretanto, encontramos significativo acúmulo de linfócitos T e B no baço de animais infectados. Em conjunto, nossos resultados demonstram que as alterações observadas no componente epitelial do microambiente tímico, assim como em timócitos de animais infectados favorecem a migração e morte destes timócitos e a atrofia desse tecido. Além disso, demonstramos que células do timo possuem papel imunoregulatório no baço durante a infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITOS DA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE OS COMPONENTES LINFÓIDE E MICROAMBIENTAL DO TIMO: RELAÇÃO COM INTERAÇÃO TIMÓCITO-EPITÉLIO TÍMICO E MORTE CELULAR.

ABSTRACT

PHD THESIS

Désio Aurélio Farias de Oliveira

Trypanosoma cruzi infection promotes lymphoid organ alterations. The thymus is atrophied with CD4⁺CD8⁺ (DP) thymocyte depletion in the acute phase of infection. In peripheral lymphoid organs, subcutaneous lymph nodes (LSC) and spleen present hypertrophy, with increase of T and B cells, whereas mesenteric lymph nodes (LM) are atrophied due to the death of these cells. In this work, we studied the effects of *T. cruzi* infection in thymic epithelial cells (TEC) and thymocytes, as well as the role of thymus in the behavior of peripheral lymphoid organs. In experiments of *in vitro* infection, we evaluated TEC, concerning the expression of extracellular matrix (ECM) ligands and receptors, and also the possible consequences of ECM increase in TEC/thymocyte or TEC/parasite interactions. Our data demonstrate that *T. cruzi* infection promotes a decrease of TEC number, morphological alterations and ECM increase in infected cultures. We observed that ECM components are required in the interaction between TEC and parasites. Curiously, the decrease in TEC number in infected cultures is associated to cell cycle inhibition but not to apoptosis. Concerning TEC/thymocyte interactions, we observed that adhesion was greater in infected cultures, especially on parasitized TEC. This increase in TEC/thymocyte adhesion corroborates the hypothesis previously described by our group that the infection favors migration of thymocytes to the periphery. Extending our analysis to thymic lymphoid compartment, we investigated thymocyte apoptosis following infection. We observed that thymus cellularity decreases during infection, together with the increase of apoptosis in CD4⁻CD8⁻ (DN), DP, CD4 and CD8 thymocytes. Searching to understand what death pathway is involved in thymocyte apoptosis, we demonstrated that the activity of total caspases, caspase-8, caspase-9 and caspase-

3 (effector caspase) are increased in infection. We observed that both initiator caspase-8 (extrinsic pathway, Fas, TNF, TRAIL) and caspase-9 (intrinsic pathway, factor deprivation) seem to be involved in thymocyte depletion. These data were confirmed in death blocking experiments with caspase inhibitors, in which we showed that *in vivo* (intrathymic injection) and *in vitro* treatments with zVAD (general caspase inhibitor) were more effective in blocking thymocyte death than the inhibitors of caspase-8 (zIETD) or caspase-9 (zLEHD) separately. Moreover, infected animals treated with zVAD showed a partial recovery of thymus cellularity, more specifically in DN and DP thymocytes. Finally, searching to understand the role of the thymus in the regional immune response of peripheral lymphoid organs in infection, mice were thymectomized prior to infection to evaluation of LSC, LM and spleen cellularity. Our data demonstrated that, even in the absence of the thymus, LSC hypertrophy and LM atrophy were not altered; however, we found a significant accumulation of T and B lymphocytes in the spleen of infected animals. Conjointly, our results show that the alterations observed in the epithelial component of the thymus microenvironment, as well as in thymocytes of infected animals favor the migration and death of thymocytes and the atrophy of this tissue. Besides that, we demonstrated that thymic cells have an immunoregulatory role in the spleen during infection.

ÍNDICE

Resumo	vii	
Abstract	ix	
Índice de Figuras	xiii	
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiv	
1	Introdução	1
1.1	Timo: características gerais	1
1.1.1	Ontogenia e Involução.....	2
1.1.2	Microambiente Tímico	3
1.2	Expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular por células do microambiente tímico.	12
1.3	Diferenciação intratímica de células T e os processos seletivos	13
1.4	Características moleculares da morte celular por apoptose	17
1.4.1	Vias de Ativação de Apoptose	18
1.4.2	Proteínas Inibidoras da Apoptose.....	22
1.5	Doença de Chagas	24
1.6	Imunopatologia da doença de Chagas	25
1.6.1	Fases da doença de Chagas.....	25
1.7	Resposta imune na infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	27
2	Objetivos	39
2.1	Objetivo geral:	39
2.2	Objetivos específicos:	39
3	Documento 1	40
4	Documento 2	50
5	Documento 3	87
6	Documento 4	116
7	Discussão	143

8	Conclusões e perspectivas	150
9	Referências Bibliográficas	151
10	Anexos	186
10.1	Artigos científicos em colaboração, publicados durante a realização da tese	186

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Desenvolvimento intratímico dos linfócitos T.....	16
Figura 1.2: Vias de ativação de caspases.....	21
Figura 1.3: Estimativa global da população infectada pelo <i>T. cruzi</i>	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta\psi$	Potencial da membrana mitocondrial
AICD	Morte celular induzida por ativação, do inglês <i>Activation Induced Cell Death</i>
AIRE	Fator de transcrição regulador de autoimunidade, do inglês <i>Autoimmune regulator</i>
Akt	Classificação temporária para Proteína Quinase B.
ALPS	Síndrome Linfoproliferativa Autoimune do inglês <i>Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome</i>
APAF1	Fator de ativação de protease apoptótica, do inglês <i>Apoptotic Protease-Activating Factor-1</i>
Bad	Promotor de morte associado a Bcl-2, do inglês <i>Bcl-2 Associated Cell Promoter</i>
Bak	Matador antagonista homólogo a Bcl-2, do inglês <i>Bcl-2 Homologous Antagonist killer</i>
Bax	Proteína X associada a Bcl-2, do inglês <i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl-2	Linfoma 2 de Células B, do inglês <i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl2-A1	Proteína A1 relacionada a Bcl-2, do inglês <i>Bcl-2 Related Protein A1</i>
Bcl-w	Antiga classificação para Bcl-2 L2, Proteína 2 tipo BCL-2, do inglês <i>Bcl-2 Like Protein 2</i>
Bcl-xL	Linfoma de células B extra grande, do inglês <i>B Cell Lymphoma Extra Large</i>
Bik	Matador interante de Bcl-2, do inglês <i>Bcl-2 Interacting Killer</i>
Bim	Antiga classificação para Bcl-2 L11, Proteína 11 tipo Bcl-2, do inglês <i>Bcl-2 Like Protein 11</i>
CCL	Ligante de cisteína para quimiocina, do inglês <i>Chemokine Cystein Ligand</i>
CCR	Receptor de cisteína para quimiocina, do inglês <i>Chemokine Cystein Receptor</i>
CD	Conjunto de diferenciação, do inglês <i>Cluster of Differentiation</i>
c-FLIP	Proteína Inibidora tipo FLICE celular, do inglês <i>FLICE-like cellular inhibitory protein</i>
IAP	Proteína Inibidora de Apoptose, do inglês <i>Inhibitor Apoptosis Protein</i>
CK	Creatina Quinase, do inglês <i>Creatin Kinase</i>
Ck	Citoqueratina, do inglês <i>Cytokeratin</i>
c-KIT ou CD117	Receptor do fator de célula tronco SFC do inglês <i>stem cell factor</i>
cTECs	Célula epitelial tímica cortical, do inglês <i>Cortical Thymic Epithelial Cell</i>
CXCL	Ligante de cisteína/aminoácido para quimiocina, do inglês <i>Chemokine Cystein - Aminoacid(X) Ligand</i>
CXCR	Receptor de cisteína/aminoácido para quimiocina, do inglês <i>Chemokine Cystein - Aminoacid(X)Receptor</i>

DN	Duplo negativa, do inglês <i>Double Negative</i> para moléculas CD4 e CD8 (CD4 ⁻ CD8 ⁻)
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DP	Duplo positiva, do inglês <i>Double Positive</i> para moléculas CD4 ⁺ e CD8 ⁺ (CD4 ⁺ CD8 ⁺)
ECM	Matriz extracelular, do inglês <i>Extracellular Matrix</i>
EHS	Tipo de sarcoma, do inglês <i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
EpCAM1	Molécula de adesão celular epitelial 1, do inglês <i>Epithelial Cellular Adhesion Molecule 1</i>
EphB	Receptor tirosina-quinase da família EphB, do inglês <i>Ephrin B</i>
EphrinB1	EfrinaB1, ligante do receptor EphB, do inglês <i>Ephrin B1</i>
FADD	Domínio de morte associado ao Fas, do inglês <i>Fas Associated Death Domain</i>
FADDdd	Forma dominante de FADD, do inglês <i>Fas Associated Death Domain (Dominant)</i>
Fas ou CD95	Receptor de morte da família TNF (fator de necrose tumoral), do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
FasL	Ligante de Fas , do inglês <i>Fas Ligand</i>
FGF	Fatores de crescimento de fibroblasto, do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FLICE	Proteína inibidora de Apoptose FLICE, do inglês <i>FLICE Inhibitor Apoptosis Protein</i>
FN	Fibronectina, do inglês <i>Fibronectin</i>
GAG	Glicosaminoglicanas, do inglês <i>Gligosaminoglicans</i>
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês <i>Granulocyte/Macrophage-Culture Stimulating Factor</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IAP	Proteína inibidora de apoptose, do inglês <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular, do inglês <i>InterCellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN-γ	Interferon-gama, do inglês <i>Interferon-gama</i>
IL	Interleucina, do inglês <i>Interleukin</i>
IL7-R	Receptor de interleucina-7, do inglês <i>Interleukin-7 Receptor</i>
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida, do inglês <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
kDa	Unidade de peso molecular Quilodalton, do inglês <i>Kilodalton</i>
LFA-1	Antígeno-1 associado à função linfocitária, do inglês <i>Lymphocyte Function Associated Antigen 1</i>
LM	Laminina, do inglês <i>Laminin</i>
Ly-51	Glicoproteína homodimérica de 140 kD, também conhecida como 6C3/BP-1. É expressa por progenitores de células B, linhagens celulares de estroma de medula óssea, células dendríticas e epiteliais tímicas corticais
Mcl-1	Proteína de diferenciação de leucemia mielóide induzida, do inglês, <i>Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein</i>

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos 1, do inglês <i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
mTEC	Célula epitelial tímica medular do inglês <i>Medullary Thymic Epithelial Cell</i>
MTS-15	Marcador de estroma tímico 15, do inglês <i>Marker of Thymic Stroma 15</i>
MyD88	Gene 88 da resposta primária de diferenciação mielóide, do inglês <i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NAIP	Gene que compõe grupo dos inibidores de apoptose
NF-kB	Fator nuclear amplificador da cadeia leve Kappa de células B ativadas, do inglês <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
NK	Células matadoras naturais, do inglês <i>Natural Killer</i>
nm	Unidade de medida, nanômetro, do inglês <i>Nanometer</i>
NO	Óxido nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>
Noxa	Molécula pró-apoptótica da família Bcl-2
NP-1	Neuropilina-1
P2X7	Classificação temporária para P2RX7, receptor purinérgico para recrutamento de panexinas, do inglês <i>Pannexin Receptor 2 X7</i>
P2Z	Receptor purinérgico para recrutamento de panexinas, do inglês <i>Pannexin Receptor 2 Z</i>
PG	Proteoglicanas, do inglês <i>Proteoglycans</i>
PTR	Células fagocitárias do retículo tímico do inglês <i>Phagocytic cells of the thymic reticulum</i>
Puma	Modulador de apoptose superregulado por p53, do inglês <i>P53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
RAG	Gene de ativação de recombinação, do inglês <i>Recombination Activating Gene</i>
RANTES	Classificação temporária para CCL5, quimiocina regulada sob ativação de células T, do inglês <i>Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
RGDS	Tetrapeptídeo composto por arginina, glicina, asparagina e serina
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
Sca-1	Ataxina espinocerebelar 1, do inglês <i>Spinocerebellar Ataxia 1</i>
Sema-3A	Semaforina 3A, do inglês <i>Semaphorin 3A</i>
Smac/DIABLO	Segundo ativador de caspases derivado de mitocôndria/Proteína de ligação direta IAP, do inglês <i>second mitochondria-derived activator of caspases / Directed IAP-Binding Protein with Low PI</i>
SP	Célula simples positiva para marcadores CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ , do inglês <i>Single Positive</i>
TCR	Receptor de células T, do inglês <i>T Cell Receptor</i>
TEC	Célula epitelial tímica, do inglês <i>Thymic Epithelial Cell</i>

TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta, do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th	Linfócitos T CD4 ⁺ auxiliares, do inglês <i>T Helper</i>
TIV-C	Colágeno tipo IV, do inglês <i>Type-IV Collagen</i>
TLR	Receptor tipo Toll, do inglês <i>Toll Like Receptor</i>
TNC	Células epiteliais do tipo “Nurse”, do inglês <i>Thymic Nurse Cells</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
TNF-R	Receptor para fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TPM	Transição da permeabilidade mitocondrial, do inglês <i>Mitochondrial Permeability Transition</i>
TRADD	Receptor da família TNF associado a um domínio de morte, do inglês <i>TNF Receptor Associated Death Domain protein</i>
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado à TNF, do inglês <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TS	<i>Trans</i> -sialidase, do inglês <i>Trans-sialidase</i>
VLA	Antígeno muito tardio, do inglês <i>Very Late Antigen</i>
XIAP	Inibidor de proteína de apoptose ligada ao X, do inglês <i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
WHO	Organização mundial de saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Timo: características gerais

O timo é um órgão primário do sistema imune, sendo nos mamíferos localizado em posição supracardíaca no mediastino superior. Possui dois lobos que são envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, de onde partem septos, que penetram no parênquima do órgão separando parcialmente cada lobo em lóbulos tímicos. Cada lóbulo apresenta três regiões distintas, caracterizadas pela quantidade relativa e estágios de diferenciação de timócitos, e ainda da distribuição de diferentes tipos celulares no seu microambiente: 1) região córtico-medular, primeiro sítio de localização de precursores provenientes da medula óssea, 2) região cortical, caracterizada pela maior concentração de timócitos imaturos, 3) região medular, na qual a proporção de timócitos é menor que no córtex, e onde em diversas espécies estão localizados os corpúsculos de Hassall, agregados concêntricos de células epiteliais com alto grau de queratinização, e cuja função ainda não está bem determinada, além disso, na região medular encontra-se a maior concentração de timócitos imunocompetentes, aptos a migrar para órgãos linfóides periféricos (Lind, 2001; Crivellato, 2004; Takahama, 2006; Mori, 2007; Takahama, 2009; van Ewijk, 2011). Os progenitores de linfócitos T que se desenvolvem no timo são derivados de células tronco hematopoéticas que migram ativamente para o timo, interagindo com o microambiente cortical e medular através de interações célula-célula e célula-matriz extracelular (ECM) ou ainda através da liberação de fatores solúveis (Savino, 2002; Savino, 2004; Ciofani e Zuniga-Pflucker, 2007; Ocampo, 2008). Estas interações celulares determinam a migração e diferenciação dos precursores, que é comumente caracterizada pela expressão temporal e coordenada de proteínas de superfície celular, que incluem entre outras, as moléculas CD24, CD25, CD44, CD4, CD8 e o receptor clonal de linfócitos T (TCR) (Takahama, 2006; Nitta, 2008). Conseqüentemente, a interação dos timócitos com o microambiente tímico e sua gradual diferenciação gera um repertório intratímico de células T, diverso e funcional, restrito ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e tolerante aos antígenos próprios do organismo (Petrie e Zuniga-Pflucker, 2007).

Finalmente, como resultado da migração e diferenciação de timócitos, os linfócitos T maduros, selecionados no timo, são liberados para a circulação sanguínea indo colonizar regiões específicas nos órgãos linfóides periféricos, as

chamadas áreas timo-dependentes. A dinâmica da migração dos timócitos em desenvolvimento através destes distintos microambientes é crucial para a seleção e formação deste repertório de células T que iremos discutir detalhadamente nas seções posteriores (Nitta, 2008).

1.1.1 Ontogenia e Involução

A origem embrionária do microambiente tímico foi classicamente descrita como tendo participação do endoderma das 3^{as} e 4^{as} bolsas faríngeas e do ectoderma a partir da 3^a fenda branquial (Lobach e Haynes, 1987). Entretanto, estudos recentes demonstraram a origem unicamente endodérmica do epitélio tímico, sem nenhuma participação do ectoderma. Nestes estudos, que utilizaram transplantes ectópicos, o endoderma das 3^{as} bolsas faríngeas, isolado antes do contato com o ectoderma, foi capaz de originar um timo funcional com regiões cortical e medular organizadas, refutando assim o modelo da dupla-origem do epitélio tímico (Gordon, 2004; Rodewald, 2008). Por outro lado, as células mesenquimais seriam oriundas de precursores da crista neural e originariam cápsula, septos e vasos (Le Lievre e Le Douarin, 1975; Rodewald, 2008). Na análise da origem hematopoética dos timócitos foi evidenciado que no início da vida fetal, as células precursoras pré-tímicas derivam da parede do saco vitelino, e mais tarde do fígado fetal e da medula óssea (Ford e Micklem, 1963; Stutman, 1969).

O primórdio tímico é colonizado com células de origem hematopoética, em ondas de migração que ocorrem no período embrionário, no 12^o dia de vida fetal, e muito provavelmente no período pós-natal. Os primeiros linfócitos aparecem no timo de camundongos, no dia 12 de gestação, e a partir daí, ocorre uma grande proliferação linfocitária, com aparecimento da distinção córtico-medular a partir do 17^o dia de gestação, e aumento do tamanho do órgão (Sunjara, 2000; Zhang, 2007a).

Uma série de resultados mostrou que não só a linfopose intratímica depende do microambiente, mas que também o desenvolvimento do próprio microambiente tímico depende dos linfócitos em diferenciação, caracterizando assim uma interação bidirecional entre os dois compartimentos (Boyd, 1993; Brabb, 1997; Zhang, 2007a).

Nos camundongos, o desenvolvimento do timo acompanha o crescimento do animal até a 4^a- 6^a semana de vida pós-natal, enquanto que em humanos, este

órgão atinge seu tamanho máximo nos primeiros 12 meses de vida, e contrariamente à crença de que sua involução se inicia na puberdade, o órgão começa a involuir já ao fim do primeiro ano de vida pós-natal, à taxa de 3% ao ano, até a meia-idade, quando esta taxa se reduz para menos de 1% ao ano. Em camundongos velhos (dois anos), se torna evidente o processo de atrofia tímica, com sua função linfopoética bastante reduzida. Foi verificado, por exemplo, que esses animais produzem menos de 1% dos timócitos gerados pelo timo de recém-natos (George e Ritter, 1996). A função endócrina do timo diminui com a idade, conforme verificado pelos níveis decrescentes de um hormônio tímico, a timulina, refletindo assim uma alteração do microambiente tímico no envelhecimento (Savino, 1983). Além da involução natural do órgão, pode ocorrer involução tímica em qualquer período da vida, sob diferentes tipos de estresse, incluindo infecções agudas (Savino, 2006; Gameiro, 2010).

1.1.2 Microambiente Tímico

O microambiente tímico é essencial para a maturação dos linfócitos que em seguida povoarão órgãos linfóides secundários, sendo constituído por uma rede tridimensional, composta por células e componentes da ECM (Savino, 2000; Ocampo, 2008). O epitélio tímico é majoritário e também heterogêneo, fato este que levou diversos autores a definirem subpopulações de células epiteliais, considerando-se a morfologia, o padrão de eletrodensidade citoplasmática (Kendall, 1985), assim como a expressão de diferentes fenótipos, definidos por anticorpos monoclonais, com marcação cortical e medular no microambiente tímico (Kampinga, 1989). Outros estudos, incluindo aqueles realizados em nosso laboratório, relacionados à expressão de citoqueratinas, sugeriram a existência de uma plasticidade do epitélio tímico, com determinada citoqueratina sendo expressa em diferentes regiões do timo, dependendo da espécie e da idade estudada (De Souza e Savino, 1993; Vicente, 1996). Além disso, diferentes estímulos, incluindo hormônios glicocorticóides, autoimunidade e a infecção pelo *T. cruzi* foram capazes de corroborar tal plasticidade (Savino, 1989; Lannes-Vieira, 1991; Lannes-Vieira, 1992; De Souza e Savino, 1993; De Souza, 1993; Correa-de-Santana, 2006b).

As células do estroma tímico emitem múltiplos sinais que promovem o desenvolvimento dos timócitos que são essenciais para a manutenção da população de células T circulantes. Em resposta a estes sinais, os timócitos em

desenvolvimento são induzidos a proliferar e migrar através do parênquima tímico, diferenciando-se em linfócitos T maduros. Estas etapas do desenvolvimento dos linfócitos T ocorrem em regiões anatômicas específicas do timo, onde uma variedade de células estromais especializadas se localiza (von Boehmer, 2003; von Boehmer, 2004; Petrie e Zuniga-Pflucker, 2007). Como mencionado anteriormente, elementos da matriz extracelular em conjunto com as células estromais constituem o microambiente tímico, sendo este crucial para migração e diferenciação dos timócitos (Savino, 2006). Neste contexto, abordaremos a seguir a participação de diferentes tipos celulares que compõem o estroma tímico, em particular das TECs, detalhando sua importância na fisiologia do timo.

1.1.2.1 Células Epiteliais

As células epiteliais tímicas (TEC) constituem o principal componente celular do microambiente tímico, formando neste uma rede tridimensional com significativa heterogeneidade morfológica e fenotípica (Zhang, 2007b; Anderson, 2009). Na região subcapsular, estão destacadas as células epiteliais do tipo *nurse* (TNC – thymic nurse cells), células que formam um complexo linfoepitelial, com capacidade de englobar de 2-200 timócitos em sua maioria imaturos, com fenótipo TCR $\alpha\beta$ ^{low}DP (Guyden e Pezzano, 2003). As células epiteliais tímicas do tipo *nurse* expressam moléculas de classe I e II do MHC, requeridas na diferenciação intratímica dos linfócitos T (possivelmente participando em eventos de seleção positiva e negativa), secretam hormônios (oxitocina e vasopressina), e produzem moléculas de ECM tais como fibronectina, laminina e colágeno do tipo-IV (Wekerle e Ketelsen, 1980; Geenen, 1989; Villa-Verde, 1995; Ribeiro-Carvalho, 2007).

O epitélio tímico é o componente majoritário do microambiente tímico, sendo interconectado por desmosomas formando uma rede tridimensional preenchida por timócitos em desenvolvimento (Savino, 2003; Ciofani e Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta, 2008).

As TECs formam um tecido heterogêneo, considerando sua morfologia, fenótipo e função. As subpopulações de TECs podem ser definidas de acordo com a expressão diferencial de citoqueratinas (Ck) e de outros marcadores. As TEC corticais (cTECs) são caracterizadas pela expressão de citoqueratina 8 (K8), EpCAM1 (molécula de adesão celular epitelial 1) e de Ly-51 (Glicoproteína expressa por progenitores de células B, linhagens celulares de estroma de medula óssea,

células dendríticas e epiteliais tímicas corticais). Expressam ainda moléculas classe I e classe II do MHC. As cTECs estão relacionadas ao recrutamento dos precursores hematopoéticos do sangue, comprometimento destes precursores com a diferenciação em linfócitos T, polarização da migração dos timócitos, indução do gene da recombinase e da recombinação V(D)J, controle da expansão dos timócitos, expressão dos co-receptores CD4 e CD8 e seleção positiva. Cada uma destas funções ocorre em resposta à expressão de Notch e de diferentes integrinas, e à produção de proteínas da ECM e de citocinas pelas cTECs (Derbinski, 2001; Ciofani e Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta, 2008).

As TEC medulares (mTECs) apresentam fenótipo EpCAM1⁺Ly-51⁻. Foi demonstrado por análise de cortes histológicos a expressão da citoqueratina 5 (K5), além da expressão das moléculas do MHC classe I e II. As mTECs estão relacionadas com a atração dos timócitos positivamente selecionados, com a indução de tolerância central e com a migração das células T maduras para a periferia (Ciofani e Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta, 2008). A interação dos receptores de célula T e dos complexos peptídeo-MHC representa um exemplo clássico de uma interação que determina o destino no desenvolvimento dos timócitos. As células epiteliais tímicas medulares (mTECs) são cruciais no controle da autoimunidade devido à expressão promíscua de antígenos tecido-específicos (TRAs) que selecionam negativamente os clones de células T auto-reativos e possivelmente promovem a geração das células T regulatórias (Boehm, 2003; Ciofani e Zuniga-Pflucker, 2007).

A expressão promíscua de TRAs não-tímicos pelas mTECs está sob controle do fator de transcrição regulador da auto-imunidade (Aire) (Anderson, 2002). A proteína Aire promove uma atividade transcripcional de várias localidades cromossômicas, aumentando a expressão de genes pelas mTEC, que normalmente só seriam expressos em tecidos específicos. Este arranjo de proteínas é apresentado aos timócitos pelas mTECs ou por células dendríticas. Os timócitos que reconhecem estes antígenos são removidos por deleção clonal via apoptose. No entanto, alguns devem sobreviver adotando destinos alternativos com propriedade regulatória, ao invés de atividade efetora autorreativa (Derbinski, 2005; Mathis e Benoist, 2007).

Outra importante característica das células epiteliais é a presença de moléculas de adesão, que possibilitam uma interação direta com os timócitos. Foi demonstrado, por exemplo, que as TEC se ligam aos timócitos via LFA-3 e ICAM-1 a

seus ligantes CD2 e LFA-1 respectivamente, assim como, através de elementos de ECM (Vollger, 1987; Villa-Verde, 1995).

Como anteriormente mencionado, as TEC também são capazes de influenciar a maturação intratímica de células T, através do contato mediado por moléculas de classe I e de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou ainda através da produção de mediadores celulares como interleucinas do tipo IL-1, IL-3, IL-6, IL-7 e GM-CSF, hormônios tímicos (Dardenne e Savino, 1994; Haks, 1999). Além disso, após injeção de corante intracelular em cultura de TEC de camundongo, Nihei confirmou a existência de comunicação entre TEC/TEC, assim como em cultura primária de TEC humanas (Nihei, 2010). Adicionalmente, nosso grupo de trabalho também demonstrou a existência de junções comunicantes do tipo *gap* TEC/TEC, como também entre TEC/timócitos, sugerindo que este canal comunicante represente uma via adicional de interação entre essas células no processo de diferenciação intratímico (Alves, 1998).

Apesar de as TEC serem o tipo celular mais abundante do timo, foram verificadas, através de marcação com anticorpos específicos para citoqueratina, regiões livres de epitélio. Essas áreas são encontradas em ratos (Duijvestijn, 1982), em camundongos (Godfrey, 1990) e em humanos (Von Gaudecker, 1997). A função da região livre de epitélio é desconhecida, apesar de ser cogitada como uma área de proliferação de timócitos na ausência de seleção. Os linfócitos encontrados são principalmente DP, expressam $TCR_{\alpha\beta}^{low}$, sendo também vistos alguns macrófagos e células dendríticas (Bruijntjes, 1993). No presente trabalho, utilizamos a linhagem de células epiteliais tímicas murina, denominada IT-76M1. Esta linhagem está disponível, sendo rotineiramente mantida em nosso laboratório (Dardenne, 1989).

1.1.2.2 Células Dendríticas

As células dendríticas do timo são conhecidas por sua morfologia com finos prolongamentos citoplasmáticos. Sua origem é hematopoética, predominam na junção cortico-medular sendo também encontradas no cortex e na medula (Naquet, 1999). Foi postulado que estas células são oriundas da medula óssea, embora em camundongos pareçam desenvolver-se no órgão a partir de um precursor linfóide comum, capaz de dar origem também às células T e B. Do ponto de vista funcional, as células dendríticas assim como as mTEC participam dos eventos que culminam

com a tolerância central de células T tímicas, sendo requeridas no processo de seleção negativa de timócitos com potencial autorreativo (Krueger, 2011). O evento da tolerância central das células T no timo depende de mecanismos distintos, tais como, deleção clonal dos timócitos autorreativos e formação das células T regulatórias. As células dendríticas medulares apresentam uma gama de peptídeos tecido-específicos às células T em desenvolvimento, sendo responsáveis pelo fenômeno de seleção negativa (Heath, 2004; Kyewski e Derbinski, 2004). Fenotipicamente, as células dendríticas do timo expressam CD11c, altos níveis de moléculas de classe I e classe II do MHC, ICAM-1, LFA-1, e ainda Sca-1, Sca-2, CD117, CD90 e CD45 (Ardavin, 1997; Bodey, 2004).

1.1.2.3 Macrófagos

Estão localizados em todas as regiões do timo, apresentando fenótipo diferenciado de acordo com a região. Estas células têm a capacidade de se associar a timócitos, formando rosetas tímicas, sendo que a razão desta associação é desconhecida. Entretanto, foi proposto que macrófagos corticais caracterizam-se por conter inúmeros lisosomas com restos celulares produto da reabsorção de timócitos em apoptose, provavelmente decorrentes dos processos de seleção intratímica, explicando a não detecção da morte maciça em cortes de timo normal (Sprent, 1996; Oliveira-dos-Santos, 1997). Macrófagos localizados na região córtico-medular são denominados metalofílicos, se distinguem por uma alta e não específica atividade esterase, sendo identificados por marcação com impregnação por prata. Foi proposto que esses macrófagos estão mais relacionados ao processo de seleção negativa, visto que expressam moléculas de classe I e II do MHC, indicando que de fato essas células desempenham funções distintas no processo de seleção intratímica dos linfócitos. Foi também verificado que macrófagos localizados na junção córtico-medular são capazes de reconhecer e fagocitar células apoptóticas, preferencialmente timócitos, enquanto que aqueles localizados na região medular produzem citocinas que ativariam a proliferação de timócitos maduros (Sprent, 1988; Milicevic e Milicevic, 2004). É importante destacar que durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, macrófagos tímicos representam importante reservatório para o parasita, tendo seu padrão de localização alterado na infecção, por dispersão destas células no sentido da região cortico-medular para a região cortical do timo (Da Costa, 1991; Morrot, 2011).

1.1.2.4 Células Fagocitárias do Retículo Tímico

Este tipo celular compreende uma população não-linfóide e não epitelial, sendo assim classificada por não apresentar tonofilamentos de queratina, e não produzir timulina (Papiernik, 1983). Dentre as principais características funcionais, destacamos: a) são células potencialmente apresentadoras de antígeno, uma vez que expressam moléculas de classes I e II do MHC, sendo esta expressão regulada por IFN- γ e prostaglandinas (Papiernik e Homo-Delarche, 1983); b) estão envolvidas na proliferação de timócitos DN em presença de IL-2 recombinante; c) são produtoras de IL-1, prostaglandina E-2 assim como deoxinucleosídeos pirimídicos que poderiam ser utilizados na síntese de DNA de linfoblastos tímicos (Papiernik e Homo-Delarche, 1983; Penit e Papiernik, 1986; Papiernik, 1987; Rocha, 1988; Fontecha, 1991).

Foi demonstrado em nosso Laboratório, que as PTR expressam moléculas de ECM, tais como fibronectina, laminina e colágeno do tipo-IV, expressando também os receptores VLA-5 e VLA-6. Funcionalmente, essas moléculas participam na formação de rosetas heterotípicas entre células PTR e timócitos recém-isolados (Ayres-Martins, 2004).

1.1.2.5 Fibroblastos

Os fibroblastos tímicos foram identificados nas regiões de tecido conjuntivo tais como cápsula e septos (Lobach e Haynes, 1987). Células da linhagem fibroblastóide de timo humano HT-5 e HT-7 expressam moléculas de ECM tais como, fibronectina e colágeno tipo I (Savino, 1986). Além disso, foi verificado que fibroblastos, além das células epiteliais, são importantes durante os estágios iniciais de diferenciação intratímica, uma vez que no início da diferenciação das células precursoras TCR⁻CD4⁻CD8⁻ (DN) em células TCR⁺ CD4⁺ ou CD8⁺ necessitam da interação com estes dois tipos celulares (Anderson, 1997). Provavelmente, os fibroblastos influenciam na maturação de timócitos por mecanismos de contato célula-célula e/ou pela produção de ECM. Outros achados sugeriram que fibroblastos, também secretam quimiocinas no timo, tais como CCL19 e CC21, as quais são fundamentais nos processos de migração (Kim e Broxmeyer, 1999; Gray, 2007). Adicionalmente, foi verificado que fibroblastos tímicos MTS-15⁺ são essenciais na proliferação e maturação de TECs durante a embriogênese, através

da produção dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) 1, 7 e 10. É interessante notar que estes fatores de crescimento em conjunto com a produção da IL-6 e IL-7, são ainda necessários na regeneração do timo em eventos de injúria (Jenkinson, 2003; Gray, 2007).

1.1.2.6 Matriz Extracelular

As duas principais classes de macromoléculas que formam a ECM são: proteoglicanas (PGs) e glicosaminoglicanas (GAGs), compostas por cadeias de polissacarídeos que podem ou não estar ligadas a uma cadeia polipeptídica, formando então as proteoglicanas; e as glicoproteínas, divididas funcionalmente em proteínas estruturais, como é o caso do colágeno e elastina, e ainda as proteínas adesivas, como fibronectina (FN) e laminina (LM) (Geiger, 2001; Ozbek, 2010) que detalharemos a seguir.

A **fibronectina** é uma glicoproteína heterodimérica cujas subunidades estão unidas por ligação dissulfídica próxima à região carboxi-terminal. É importante destacar a capacidade da fibronectina em interagir com uma grande variedade de macromoléculas como colágeno, fibrina, heparina e proteoglicanas, como também a um grande número de tipos celulares (Hynes e Yamada, 1982) e ao *Trypanosoma cruzi*, facilitando a invasão celular pelo parasita (Ouaissi, 1985). Apesar de a fibronectina ser codificada por um único gene, existem formas variantes, resultantes de *splicings* alternativos, a partir de um único mRNA precursor (Miyamoto, 1998).

A fibronectina contém seis sítios capazes de mediar adesão celular e que podem ser agrupados em três regiões principais: um domínio central de ligação à célula, a região III CS que sofre *splicing* alternativo, e a região que se liga à heparina, a qual tem sido demonstrada ligar-se à proteoglicana heparan sulfato na superfície celular (Thesleff, 1988; Wierzbicka-Patynowski e Schwarzbauer, 2003). Foi demonstrado que um tetrapeptídeo composto por arginina, glicina, asparagina e serina (RGDS) era capaz de mediar a interação célula a célula, quando em um substrato insolúvel (Pierschbacher e Ruoslahti, 1984), porém, quando em solução, era capaz de inibir a ligação da célula à fibronectina (D'Souza, 1991). Funcionalmente, a fibronectina participa de várias interações celulares, como observado entre células epiteliais e tímócitos, sendo que seu padrão de expressão pode ser alterado em doenças parasitárias, incluindo aquelas estabelecidas por protozoários como, *T. cruzi* e *Plasmodium berghei* (Savino, 2006; Gameiro, 2010).

Por outro lado, conceitualmente, interações moleculares envolvendo componentes da ECM na relação célula-célula ou célula-parasita, dependem de sua ligação aos respectivos receptores da família das integrinas. Nesse contexto, foi verificado recentemente que o silenciamento gênico através de interferência de RNA do receptor da fibronectina, a molécula $\alpha 5\beta 1$ (CD49e/CD29; VLA-5) em linhagem de TEC humana, resultou em comprometimento na capacidade dessas células em aderir com timócitos, indicando papel relevante da fibronectina como participante dos eventos de migração e diferenciação observados no timo (Linhares-Lacerda, 2010).

As **lamininas** são uma família de glicoproteínas que correspondem ao maior componente da membrana basal, seu peso molecular varia entre 400-900 kDa, apresentam-se como moléculas glicosiladas, tendo 25-26% de seu peso total em carboidratos. São moléculas heterotriméricas compostas de subunidades α , β e γ . Até o momento, cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ foram caracterizadas. Seus trimeros são classificados de acordo com a composição das cadeias α , β e γ , o que permitiu o isolamento de mais de 15 diferentes isoformas da laminina (Aumailley, 2005; Macdonald, 2010). Funcionalmente, estão relacionadas a diferentes eventos biológicos como, adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, que têm sido atribuídos à sua porção peptídica, embora alguns trabalhos apontem que os carboidratos sejam requeridos em algumas dessas respostas (Chammas, 1991; Chandrasekaran, 1991; Sasaki, 2004; Miner, 2008). Análises clássicas sobre a estrutura molecular da laminina provêm do tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de camundongo, onde a molécula constitui grande parte da membrana basal sintetizada e secretada, podendo ser isolada, identificada e quantificada, sem que para isso sejam utilizados agentes redutores ou desnaturantes (Timpl, 1979). A laminina do tumor de EHS, também conhecida como laminina-111 (LM111), é caracterizada como uma glicoproteína composta por três cadeias polipeptídicas, cada uma das quais possuindo diferentes domínios, com estrutura terciária, sequência e funções características (Aumailley, 2005).

As cadeias que compõem a laminina-111 são identificadas como cadeia $\alpha 1$, com massa molecular de aproximadamente 400kDa e cadeias $\beta 1$ e $\gamma 1$, de 210 e 200 kDa respectivamente. Quando ligadas, formam uma estrutura cruciforme assimétrica, com os três braços curtos similares de 35 nm compostos pela região N-terminal de cada uma das cadeias, e um braço longo de respectivamente 75nm

contendo domínios globulares com cerca de 20nm. O braço maior consiste da associação de um terço da região carboxi-terminal das unidades β e γ à subunidade α , compondo dessa forma a porção heterotrimérica da molécula. O conjunto dessas cadeias formando um heterotrímero é estabilizada por pontes dissulfídicas presentes na região próxima ao centro da cruz e na região correspondente ao C-terminal das subunidades β e γ , próxima ao domínio G da subunidade ou cadeia α (Engvall e Wewer, 1996).

Estudos relacionados ao timo humano mostram que diferentes isoformas da laminina são secretadas por células epiteliais tímicas, entre as quais a laminina-211 ($\alpha2\beta1\gamma1$), sendo requerida durante o processo de migração e diferenciação intratímica de timócitos (Ocampo, 2008). Adicionalmente, ressaltamos que a laminina é também requerida na interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira, conforme revisado por Villalta e colaboradores (Villalta, 2009), tendo seu padrão aumentado no timo de animais infectados pelo parasita (Cotta-de-Almeida, 2003; Silva-Monteiro, 2007).

O **colágeno tipo IV** (TIV-C) pertence a uma família de macromoléculas, possuindo como característica principal uma estrutura em tripla hélice. O colágeno do tipo IV, porém, é o único que forma rede e é encontrado em membranas basais. Ele possui sítios de ligação à laminina, proteoglicanas, nidogênio e à diferentes tipos celulares, em particular às células epiteliais, sendo tais interações necessárias para o arranjo supramolecular das membranas basais (Timpl e Aumailley, 1989; Yurchenco e Schittny, 1990).

A ligação das células à ECM pode facilitar sua ancoragem, ou de outro modo, favorecer a sua migração. Além disso, a matriz pode sinalizar as células para crescimento e diferenciação. A interação das células à ECM ocorre através de receptores na sua superfície, os quais pertencem principalmente à família das integrinas. Estas moléculas são heterodímeros constituídos por unidades α e β ligadas de forma não covalente, e que interligam a ECM ao citoesqueleto, sendo capazes de transduzir sinais bioquímicos para dentro da célula. O sítio de ligação com a molécula de ECM parece ser formado por sequências de ambas as subunidades, sendo que o domínio citoplasmático das integrinas faz conexão com o citoesqueleto. Os receptores da família $\beta1$ são chamados VLA (very late antigen), porque as primeiras moléculas $\beta1$ conhecidas, VLA-1 e VLA-2, não eram detectadas

em linfócitos em repouso, sendo claramente detectadas duas ou três semanas após a ativação do linfócito *in vitro* (Hynes e Naba, 2011).

1.2 Expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular por células do microambiente tímico.

Funcionalmente moléculas de ECM são requeridas não só para manter as células e tecidos unidos, como também, exercem importante papel na adesão, migração, proliferação, diferenciação, ativação e morte celular (de Sousa, 1991; Sundqvist, 1993; Geiger e Yamada, 2011; Lu, 2011), estando relacionadas a diferentes processos patológicos, como por exemplo, à invasividade de parasitas intracelulares (Nde, 2006; Cardenas, 2010). Muitas das interações entre células e ECM responsáveis por tais eventos, são mediadas por receptores de superfície celular da família das integrinas (Pribila, 2004; Hynes e Naba, 2011; Wickstrom e Fassler, 2011).

A presença de ECM no timo foi inicialmente estudada por Henry (1967) e Savino (1982), os quais demonstraram neste órgão a distribuição das fibras de reticulina e de elastina respectivamente (Henry, 1967; Savino, 1982). Em nosso laboratório, temos nos dedicado ao estudo de ligantes e receptores de ECM no timo (Savino, 2000). Foi determinado o padrão de glicoproteínas de ECM, tais como colágeno do tipo I, evidenciado essencialmente nos septos e região subcapsular; colágenos do tipo III e IV, fibronectina e laminina na junção córtico-medular, uma fina rede de fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV na região cortical e uma rede mais densa na medula, em timo humano e de camundongos. Foi verificado ainda que as células epiteliais são capazes de secretar diferentes moléculas de ECM tais como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, expressando também receptores de ECM na membrana (Berrih, 1985; Lannes-Vieira, 1991; Villa-Verde, 1995).

Estudos de ontogênese no modelo murino demonstraram que até o 17º dia de vida fetal existe um padrão em rede intralobular, na distribuição de proteínas de membrana basal, e que somente no 19º dia os padrões eram similares ao de animais adultos (Lannes-Vieira, 1991). Estes arranjos da ECM tímica podem estar diretamente relacionados a processos de migração e diferenciação dos precursores linfóides e ao crescimento de células do microambiente tímico.

Além disso, padrões de distribuição anormal de ECM intratímica foram detectados em condições patológicas tais como *myasthenia gravis* (Savino e Berrih, 1984), síndrome de Down (Fonseca, 1989), diabetes autoimune experimental (Savino, 1991) e ainda na desnutrição humana (Lyra, 1993). Outra correlação importante é quanto à presença aumentada de ECM tímica em doenças infecciosas agudas, em particular na infecção pelo *T. cruzi* (Cotta-de-Almeida, 2003; Silva-Monteiro, 2007). Nas diversas situações, foi verificada uma correlação positiva entre o aumento da rede de ECM intratímica e o grau de depleção linfocitária no órgão (Savino, 2007a; Savino, 2007b).

Do ponto de vista da expressão de receptores de ECM no timo, inicialmente foi demonstrado que timócitos imaturos DN ligam-se aos diferentes tipos celulares do microambiente via receptor de fibronectina (Utsumi, 1991). Além disso, a detecção de integrinas VLA-4 e VLA-5 (respectivamente $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$, ambos receptores de fibronectina) e VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$, receptor de laminina) nos timócitos, e de VLA-3 ($\alpha 3\beta 1$, receptor de colágeno, fibronectina e laminina), VLA-5 (Giunta, 1991; Villa-Verde, 1994) e VLA-6 (Lannes-Vieira, 1993) em TEC, sugerem um complexo processo de interação entre timócitos e células do microambiente tímico via interação ECM/integrinas (Savino, 1993). Como discutido anteriormente, é importante destacar que o silenciamento gênico da cadeia $\alpha 5$ do receptor da fibronectina (VLA-5), modula múltiplos genes e compromete a interação TEC/timócitos (Linhares-Lacerda, 2010).

Com o objetivo de facilitar o entendimento de nosso trabalho, faremos a seguir um breve resumo de alguns aspectos sobre a fisiologia do timo, e sobre fisiopatologia da doença de Chagas (incluindo as alterações tímicas já observadas).

1.3 Diferenciação intratímica de células T e os processos seletivos

Como discutimos anteriormente, os eventos de migração e diferenciação intratímica de timócitos, resulta na geração de células T maduras. Entretanto, os progenitores de células T no timo não são capazes de sustentar seu desenvolvimento indefinidamente. Dessa forma, o timo necessita ser colonizado constantemente por progenitores hematopoéticos da medula óssea ou do fígado fetal durante o desenvolvimento embrionário, a fim de manter a geração contínua de células T maduras no decorrer da vida pós-natal (Boehm, 2003).

Neste contexto, precursores tímicos migram para a região subcapsular (Lind, 2001), penetrando no córtex, iniciando os diferentes estágios de maturação, à medida que interagem com os componentes celulares do microambiente tímico até chegar à região medular (Mori, 2007). Durante o processo de diferenciação do timócito, algumas moléculas são expressas somente durante uma etapa de maturação do timócito, enquanto outras são expressas no timócito, permanecendo ao longo da vida do linfócito T (Anderson e Jenkinson, 2001).

Timócitos mais imaturos estão localizados na região subcapsular do timo, onde níveis mais altos do ligante de Notch, Delta-like1, são expressos (Schmitt, 2004). Representam 5% do total de timócitos, não expressam os co-receptores CD4 e CD8 (Palmer, 1993), nem o complexo CD3/TCR, sendo, portanto, caracterizados como duplo negativos, expressando o fenótipo (TCR⁻ DN). As células DN podem ainda ser subdivididas de acordo com a expressão das moléculas CD44 e CD25 em DN1 (CD25⁻CD44⁺), DN2 (CD25⁺CD44⁺), DN3 (CD25⁺CD44^{low}) e DN4 (CD25⁻CD44^{low}) (Nitta, 2008). Adicionalmente, foi demonstrado que os sinais desencadeados por TECs via Notch, induzem o comprometimento destas células com a linhagem linfóide (Radtke, 1999; Laiosa, 2006), entretanto, outros fatores como a Interleucina-7 (IL-7) e o ligante de c-KIT são necessários para ativação e proliferação de timócitos no estágio DN1 (Wang, 2006). No estágio de diferenciação em DN2, a expressão dos genes da recombinase (RAG) aumenta, sendo detectado o primeiro rearranjo dos genes para as cadeias TCR γ e TCR δ , mas não para a cadeia TCR β (Capone, 1998; Livak, 1999). Células do microambiente tímico, em particular as células epiteliais continuam provendo os ligantes de Notch, estimulando a continuidade da diferenciação em células T (Schmitt, 2004). No estágio DN3, ocorre o rearranjo do gene TCR β que evidencia de forma definitiva o comprometimento com a linhagem T. Nesta etapa, ocorre um processo de seleção denominado seleção β , onde as células que não apresentam rearranjo funcional do TCR β morrem, e as células bem sucedidas expressam um receptor de célula T imaturo (pré-TCR) em suas superfícies e proliferam aumentando de forma significativa o seu número (Penit, 1995; Petrie, 1995). As cadeias β recém-sintetizadas se combinam com uma glicoproteína de 33kDa, conhecida como cadeia pré-T α e se associam ao grupo CD3 para formarem um complexo denominado pré-TCR, além de aumentarem a expressão dos RNAs mensageiros que codificam para as moléculas CD4 e CD8 (Rothenberg, 2008). É caracterizado assim um estágio de transição DN/DP, frequentemente nomeadas como DN4. É importante destacar que

neste período ainda não ocorreu o rearranjo da cadeia α do TCR, para tanto é necessário que os timócitos denominados como pré-DP que neste momento já expressam os co-receptores CD4 e CD8 em sua superfície, embora em baixos níveis ($CD4^{low}CD8^{low}CD25-CD44^{low}$), parem de proliferar e os níveis da proteína RAG-2 aumentem favorecendo o rearranjo gênico da cadeia α do TCR. Assim, cada timócitos imaturos pré-DP expressando a cadeia β continuam a rearranjar os genes da cadeia α e os TCRs resultantes serão selecionados para reconhecimento do MHC próprio (Petrie, 2003; Petrie e Zuniga-Pflucker, 2007).

Posteriormente, a diferenciação gera células imaturas que expressam o fenótipo $TCR^{+}DP$, sendo classificadas como timócitos duplo positivos, localizados na maior parte da região cortical do timo, representando cerca de 80% da população total de timócitos. Neste estágio, os genes do TCR estão completamente rearranjados, ainda que em baixa densidade (TCR^{low}), favorecem sua expressão na membrana da célula, que ocorre em conjunto com o complexo CD3. Timócitos cujo rearranjo gênico resulta em um TCR não produtivo, morrem por apoptose, entretanto aqueles que expressam TCRs produtivos interagem com peptídeos apresentados por moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC).

Ainda nesta etapa da diferenciação, a especificidade dos timócitos pelo MHC classe I ou classe II é considerada como determinante na divergência entre as subpopulações CD4/CD8. Para melhor compreender esta orientação que resulta no surgimento das subpopulações simples positivas, foi verificado, que as células que passam pela seleção positiva concomitantemente superexpressam o receptor de IL7 (IL-7R) e param de expressar o marcador CD8 por negligência de sinal (Brugnera, 2000). Se a perda de sinalização via CD8 não suprimir o sinal via TCR, a expressão de CD8 continua interrompida resultando na produção da subpopulação de timócitos CD4. Por outro lado, se a célula CD8 interrompe o sinal da seleção positiva, a sinalização via IL-7R faz o silenciamento da expressão da molécula CD4, re-indução da expressão da molécula CD8 e, assim, a célula assume o fenótipo CD8 positivo (Yu, 2003). Tendo em vista estes achados, conclui-se que as células do microambiente controlam, tanto diretamente (através do contato entre as moléculas de TCR e MHC) como indiretamente (via interação IL7/IL7R), a seleção positiva de timócitos. Como resultado, as células positivamente selecionadas são designadas como células T simples-positivas (SP) $CD4^{+}$ ou $CD8^{+}$, (conforme ilustrado na Figura 1.1) aptas a colonizar áreas timo-dependentes localizadas em órgãos linfóides

periféricos (Boyd, 1993; Godfrey e Zlotnik, 1993; Anderson, 1996; Ritter e Palmer, 1999; Anderson e Jenkinson, 2001; Nitta, 2008; Wakim e Bevan, 2010).

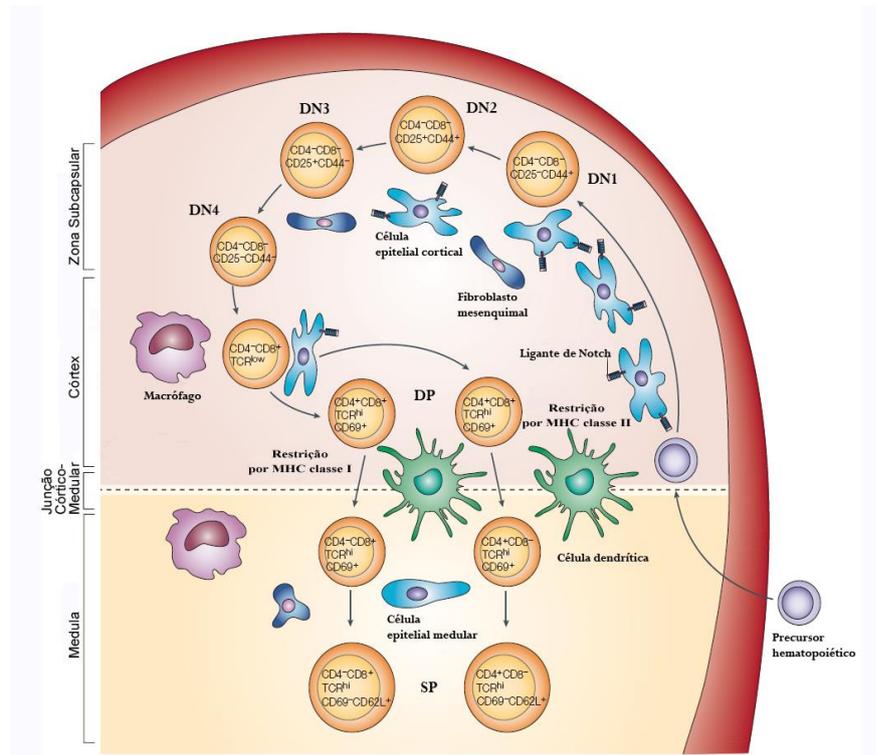


Figura 1.1: Desenvolvimento intratímico dos linfócitos T.

O microambiente tímico é organizado em duas regiões denominadas córtex e medula, onde cada uma apresenta tipos específicos de células estromais e timócitos em diferentes estágios de maturação. O fenótipo dos timócitos em diferenciação é determinado em função da expressão de diversos marcadores, como CD44, CD25, CD4, CD8 e TCR, os quais permitem sua classificação em diversas subpopulações: DN (DN1-DN4), DP e SP (CD4 e CD8). (Zuniga-Pflucker, 2004).

Eventos adicionais ocorrem em paralelo à interação TCR/MHC. Foi evidenciada a crucial participação de quimiocinas no direcionamento de timócitos durante os processos de migração e diferenciação (Savino, 2003). As quimiocinas CXCL12 (secretada por TECs, particularmente aquelas localizadas nas regiões medular e subcapsular do timo) e CCL25 (secretada por TECs e células dendríticas), atraem preferencialmente células imaturas DN e DP. Interessante que favorecendo esta interação, os timócitos imaturos em diferenciação expressam os receptores denominados CXCR4 e CCR9, respectivamente para CXCL12 e CCL25. Importante destacar que as células CD8⁺ também estão sob influência da quimiocina CCL25 (Annunziato, 2001). A quimiocina CCL19, isolada em TECs localizadas nas regiões medular e junção cortico-medular, possui atividade quimioatraente para timócitos

maduros, entretanto, foi demonstrado que esta quimiocina está também relacionada a saída de timócitos em camundongos neonatos (Ueno, 2002). Células epiteliais tímicas medulares também produzem outras quimiocinas, tais como, CXCL19, CXCL10 e CXCL11, envolvidas na migração de timócitos humanos maduros (TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $^+$) e células NK, através do receptor comum CXCR3 (Annunziato, 2001; Savino, 2002).

É importante destacar também o papel do receptor 1 de esfingosina1-fosfato (S1P $_1$) na migração de timócitos. Antes de sair do timo, as células T devem completar a seleção negativa, assim, um dos mecanismos que previne a saída prematura destas células é a regulação da expressão do receptor S1P $_1$. Foi visto que células T adquirem a habilidade de migrar em direção a S1P somente no estágio maduro simples-positivo CD4 $^+$ CD8 $^-$ e CD4 $^-$ CD8 $^+$ (CD69 low CD62 high). Células T deficientes de S1P $_1$ não conseguem deixar o timo, o que resulta no acúmulo de timócitos maduros (Allende, 2004; Matloubian, 2004).

Além disso, o CD69 tem sido postulado como uma proteína expressa em células recém ativadas (Rutella, 1999). Durante o processo de maturação, sua expressão caracteriza o início do processo de seleção positiva (Hare, 1999), e células maduras prontas para serem exportadas para a periferia deixam de expressá-la (Gabor, 1997; Ge e Chen, 1999).

Outras interações envolvendo timócitos/células do microambiente tímico são promovidas por diferentes moléculas e co-receptores durante a migração e diferenciação de timócitos, tais como, as moléculas EphrinB1/EphB (Alfaro, 2007) CD2/LFA-3, LFA-1/ICAM-1 (Singer, 1990a; Patel e Haynes, 1993), NP-1/Sema-3A (Lepelletier, 2007), e interações TEC/timócitos mediadas por ECM/integrinas (Anderson, 1996; Savino, 2000; Chiba, 2006).

1.4 Características moleculares da morte celular por apoptose

A apoptose é um programa de morte celular que requer a interação de inúmeros fatores. Alterações observadas na morfologia da célula são consequência de uma cascata de ativação de eventos moleculares, bioquimicamente específicos e geneticamente regulados (Saraste e Pulkki, 2000). Nesse contexto, a atividade de caspases tem sido requerida como crucial na indução de morte celular por apoptose. Caspases (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) pertencem à família das cisteína proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que têm a capacidade

de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (Liu e Hengartner, 1999). Foi observado que caspases desencadeiam a morte celular por apoptose, clivando esses substratos, resultando na condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana, como por exemplo a fosfatidilserina, que funcionalmente participa como sinalizadora e indicadora para que estas células apoptóticas sejam reconhecidas (Nicholson e Thornberry, 1997; Liu e Hengartner, 1999). Atualmente são conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10), estão diretamente relacionadas à morte celular por apoptose (Nicholson e Thornberry, 1997; Tait e Green, 2010), entretanto, as caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14 são ativadas durante a resposta imune inata, sendo relacionadas na regulação de citocinas inflamatórias como IL1- β e IL-18, sendo que a contribuição dessas caspases na geração de células apoptóticas ainda não está esclarecida (Boatright e Salvesen, 2003; Taylor, 2008).

1.4.1 Vias de Ativação de Apoptose

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos do DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (Hengartner, 2000). A ativação da apoptose pode ser iniciada de diferentes maneiras, incluindo por um lado a via extrínseca (através de receptores de membrana) ou por outro lado a via intrínseca (mitocondrial), conforme ilustrado na Figura 1.2.

A **via extrínseca** é desencadeada por ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de necrose tumoral (rTNF), que inclui diversos receptores, dentre os quais o TNFR-1, Fas (CD95) e TRAIL (Ghobrial, 2005). Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o que permite que eles reconheçam seus ligantes. A sinalização desencadeada pelo receptor é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma seqüência de 65 aminoácidos denominada domínio de morte sendo, por isso, chamados de receptores de morte celular (Naismith e Sprang, 1998).

Quando esses receptores reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD (Fas Associated Death Domain protein) ou TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain protein), que

ligam, dimerizam e ativam uma caspase iniciadora, denominada caspase-8. A caspase-8 ativada, diretamente cliva e ativa caspases executoras como caspases-3 e 7 ou por outro lado, recrutam e ativam moléculas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (B cell lymphoma 2) como Bax, Bim, Bak, Bik, Puma, Noxa ou Bad que irão promover alterações no potencial da membrana mitocondrial, resultando na liberação de citocromo-c. Uma vez livre no citoplasma o citocromo-c se ligará ao APAF1 (apoptotic protease-activating factor-1), formando uma estrutura denominada apoptosoma que recruta e ativa uma caspase iniciadora, a caspase-9. Na parte final a caspase-9 ativa caspases executoras como caspases-3 e 7. Estas promovem a lise do DNA que resulta na morte da célula (Tait e Green, 2010). A via de ativação mediada por Fas, desempenha papel relevante na morte por apoptose de células T. Dados da literatura revelam uma correlação entre os níveis séricos de Fas solúvel e a incidência de linfomas. Foi revelado que o Fas solúvel compete com o ligante natural inibindo a apoptose (Krammer, 2000), adicionalmente foi demonstrado que mutações que afetam a funcionalidade do Fas estão associadas a um efeito protetor da tumorigênese (Fulda e Debatin, 2006).

A **via intrínseca** é ativada em situações particulares por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes estímulos convergem principalmente para a mitocôndria, resultando na liberação de moléculas pró-apoptóticas (Desagher e Martinou, 2000). Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Simultaneamente, a água do espaço entre as membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (Loeffler e Kroemer, 2000; Gupta, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\psi$ e TPM levam a perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentam a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (Ferri, 2000). Os níveis de EROS aumentados levam à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$ (Green e Kroemer, 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Adicionalmente, foi postulado que EROS induzem a ativação das caspases-9 e 3 (Gottlieb, 2000; Gottlieb, 2001).

Alguns resultados indicam que durante a apoptose ocorre a formação de poros na membrana mitocondrial que contém diferentes proteínas e abrange as membranas

interna e externa da mitocôndria (Bossy-Wetzel e Green, 1999). Através desses poros ocorre a liberação do citocromo *c* para o citoplasma onde participa da cascata de ativação da apoptose. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e conseqüente liberação do citocromo *c* e proteínas ativadoras da apoptose para o citoplasma (Gupta, 2003). Quando no citoplasma, o citocromo *c* forma um complexo com APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1) e a caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (Budihardjo, 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa as caspases executoras 3, 6 e 7 que vão ocasionar a morte da célula (Petros, 2004; Rupnarain, 2004). A caspase-3 quando ativada, está relacionada com a morte da célula por inativação de enzimas envolvidas no reparo do DNA (ADP-ribose). A caspase-6 degrada proteínas que são requeridas para mediar a interação entre a cromatina e o núcleo celular (Lamins). Adicionalmente foi verificado que a fragmentação do DNA resulta na morte celular por apoptose. Nesse contexto, a fragmentação do DNA em unidades nucleosomais é causada por uma enzima denominada CAD (caspase activated DNase). Normalmente CAD existe como um complexo inativo com ICAD (inhibitor of CAD). Durante a apoptose, ICAD é clivado por caspase-3, liberando CAD que em seguida irá promover a fragmentação do DNA (Taylor, 2008).

Além de estar envolvida na morte celular por apoptose, já foi demonstrado que caspases são essenciais nos processos de ativação de célula T. Estudos anteriores demonstraram que linfócitos T deficientes em caspase-8 (*tcasp8^{-/-}*) não são capazes de proliferar frente a estímulos de ativação (mitógenos e antígenos) e produzir IL-2 (Salmena e Hakem, 2005). Da mesma forma, essas células (*tcasp8^{-/-}*) são resistentes à morte mediada por Fas, TNFR e TRAIL. Adicionalmente, verificou-se que pacientes com ALPS (Síndrome Linfoproliferativa Autoimune), que apresentam deficiência na ativação Fas e de caspase-8 possuem linfócitos resistentes à morte por Fas, linfadenopatia e esplenomegalia (pelo acúmulo de linfócitos nos tecidos). Além disso, os linfócitos T destes pacientes não são capazes de ativar e proliferar frente a diferentes estímulos, tornando estes pacientes susceptíveis ao aparecimento de neoplasias e infecções (Bleesing, 2000; Worth, 2006). Da mesma forma, animais com mutações no Fas (*lpr/lpr*) ou FasL (*gld/gld*), apresentam uma síndrome linfoproliferativa semelhante a de pacientes com ALPS, onde linfócitos T se acumulam nos órgãos linfóides secundários, possuem resistência a morte por Fas e baixa capacidade proliferativa (Mountz, 1994; Nagata e Suda, 1995). Caspases estão também envolvidas na fisiologia de diferentes tipos celulares promovendo produção

de interleucinas IL-1 β e IL-18 (caspases-1, -4 e -5 em humanos), proliferação de células B, diferenciação de monócitos e queratinócitos (caspases-3 e 9), controle do ciclo celular, diferenciação de macrófagos, proliferação de células T (caspase-8), produção de IL-1 (caspases-1, -11 e -12 em camundongos) e regulação de processos inflamatórios (caspase-12). Em conjunto, esses dados sugerem que caspases estão diretamente envolvidas com morte, ativação e diferenciação de diferentes tipos celulares (Salmena, 2003; Su, 2005; Galluzzi, 2008).

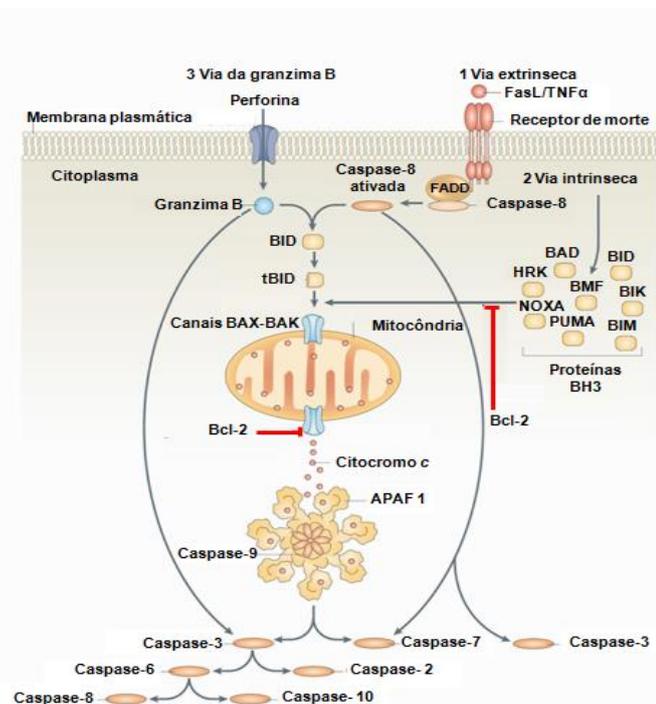


Figura 1.2: Vias de ativação de caspases.

A **via extrínseca** ocorre por ligantes à receptores de membrana da família rTNF. Uma vez ativados por um ligante específico, interagem com FADD ou TRADD, que recrutam e ativam a caspase-8. A caspase-8 ativada, ativa as caspases executoras-3 e 7. Por outro lado, a caspase-8 recruta e ativa membros pró-apoptóticos da família Bcl-2. Esses membros promovem alterações no potencial da membrana mitocondrial e liberação do citocromo-c. No citoplasma o citocromo-c se liga ao APAF1, forma o apoptosoma que recruta e ativa a caspase-9. No final, a caspase-9 ativa caspases-3 e 7. A **via intrínseca** é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Estes estímulos convergem para a mitocôndria, resultando na liberação de proteínas pró-apoptóticas. Uma vez na mitocôndria essas proteínas promovem colapso do potencial da membrana e transição da permeabilidade mitocondrial que resulta na liberação do citocromo c. No citoplasma, o citocromo c forma um complexo com APAF-1 e a caspase-9 liberando a caspase-9 ativa. A caspase-9 ativada ativa as caspases-3, -6 e -7. Em uma rota alternativa a granzima B diretamente ativa a caspase-3 (Adaptado de Taylor R. C, 2008).

1.4.2 Proteínas Inibidoras da Apoptose

Classicamente denominadas IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein), essas proteínas são moléculas que funcionalmente exercem papel antiapoptótico através de sua capacidade de bloquear a atividade de caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9, além de modularem o fator de transcrição NF- κ B. As IAP foram inicialmente isoladas do genoma de baculovírus (Deveraux e Reed, 1999). Esses vírus têm a capacidade de suprimir a apoptose nas células infectadas, através da inibição das caspases (Deveraux e Reed, 1999; Shi, 2002). Durante a apoptose, as IAP são removidas por uma proteína liberada da mitocôndria denominada Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases / Directed IAP-Binding Protein with Low PI) (Du, 2000; Verhagen, 2000).

Após dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada juntamente com o citocromo *c*. Enquanto o citocromo *c* se liga a APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com caspases (Chai, 2000). A família *c*-FLIP (FLICE-like inhibitory protein) também atua regulando apoptose. Essa proteína inibe a apoptose ligando-se ao FADD (Fas Adaptor Death Domain), uma proteína adaptadora ligada ao Fas, prevenindo assim a ativação da caspase-8/FLICE (Badley, 2000). Cinco diferentes membros das IAP já foram descritos: NAIP, XIAP, *c*-IAP, *c*-IAP-2 e survivina (Ferreira, 2002). Há evidências na literatura mostrando que a survivina é uma proteína essencial na regulação da progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência à radioterapia e à quimioterapia em diversos tipos de câncer (Li e Ling, 2006). Na família Bcl-2 há também membros anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl2-A1, Bcl-w e Mcl-1, importantes na regulação positiva da celularidade que iremos discutir a seguir (Tait e Green, 2010).

Estudos relacionados ao sistema imune, em particular ao timo, mostram a importância de mecanismos programados que regulam o balanço entre sobrevivência e morte de timócitos durante os processos seletivos. Diferentes trabalhos têm evidenciado o papel da IL-7 como promotora de ativação celular nos estágios iniciais da diferenciação de timócitos (Wang, 2006). Uma ligação entre a sinalização mediada por IL-7 e sua relação na ativação de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 para promover a sobrevivência de células DN⁺ tem sido evidenciada em diferentes estudos. Foi verificado, por exemplo, que a geração de células T em camundongos IL7R $\alpha^{-/-}$ não foi alterada, tendo em vista a aumentada expressão de

Bcl-2 nestes animais (Kondo, 1997), além disso, foi verificado nesses camundongos que a diminuição na expressão de Bim resultou em aumento na geração de células T (Pellegrini, 2004). Entretanto uma falha na diferenciação entre os estágios DN1/DN2 foi atribuída à incapacidade dessas células em receber IL-7, causando uma translocação de Bad para a mitocôndria que resultou na diminuição da sobrevivência por estas células (Li, 2004). Em estudo similar, a diminuição da sinalização via IL-7R em DN1 também causou a translocação de Bax para a mitocôndria levando esta população de timócitos a morte por apoptose (Khaled, 1999). Por outro lado, Bcl2-A1 e Akt têm sido relatados como indutores de sobrevivência desde o rearranjo do pré-TCR durante a seleção β , além de não inibir a proliferação dessas células (DN3/DN4) (Mandal, 2005; Juntilla, 2007). Importante ressaltar a dinâmica de membros da família Bcl-2 na manutenção da viabilidade celular durante os eventos de seleção intratímica. Foi observado que a atividade de Bcl-xL é crucial na manutenção das células DP anteriormente e durante a seleção do TCR (Sun, 2000; Starr, 2003; Thompson, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que Mcl-1, favorece a sobrevivência de timócitos, através de sua capacidade em bloquear atividade de Bak (Dunkle, 2010).

Adicionalmente a regulação diferencial de membros da família Bcl-2, um potencial envolvimento de receptores de morte sinalizando moléculas envolvidas na cascata de ativação de caspases tem sido demonstrado na seleção- β . Nesses estudos, camundongos que expressavam uma forma dominante de FADD (FADD^{dd}) em timócitos, apresentavam celularidade comprometida, com número reduzido de células DN4, mostrando o papel dessa molécula na ativação e desenvolvimento de timócitos (Walsh, 1998; Newton, 2000). Esses achados tomados em conjunto indicam um possível papel para IL-7 e membros da família Bcl-2, prevenindo a morte de células imaturas durante diferentes estágios da diferenciação de timócitos. Dados na literatura demonstram que além de células do hospedeiro, parasitas protozoários expressam fosfatidil serina mimetizando fagocitose de células apoptóticas (Wanderley, 2006). É importante destacar que eventos de morte celular por apoptose são também observados por estímulos exógenos no sistema imune e em particular no timo, como na infecção por parasitas intracelulares e que será detalhadamente discutida na seção 1.7.

1.5 Doença de Chagas

A doença de Chagas é o resultado da infecção causada pelo *T. cruzi*, capaz de infectar o homem, assim como uma variedade de outros mamíferos. Constitui importante problema socioeconômico e de saúde pública em diversos países, particularmente na América do Sul, África Subsaariana tropical e regiões que compõem o cinturão subtropical. Do ponto de vista epidemiológico, a doença de Chagas é uma patologia de caráter endêmico, estimando-se que entre 8-10 milhões de indivíduos estejam infectados, sendo estes mais frequentemente associados à fase crônica, e adicionais 80 milhões de indivíduos vivam em áreas de risco (Figura 1.3) (Coura e Borges-Pereira, 2010).

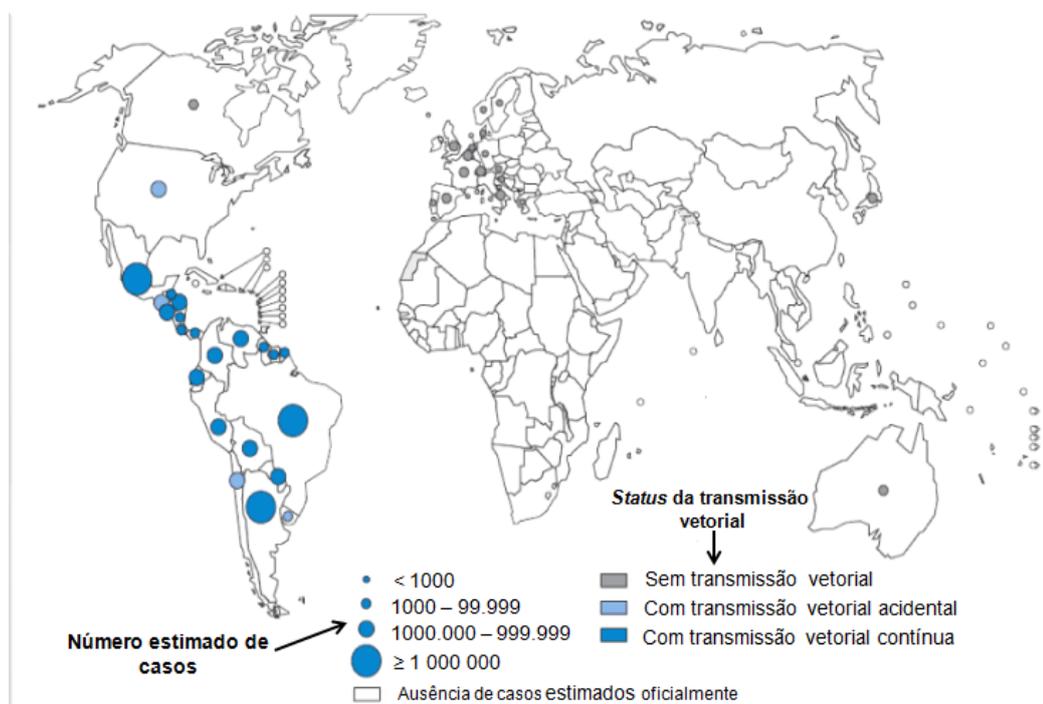


Figura 1.3: Estimativa global da população infectada pelo *T. cruzi*

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, tem como agente etiológico o *T. cruzi*. Estima-se que 10 milhões de indivíduos estejam infectados na região das Américas, sendo classificada como uma doença de caráter endêmico. A transmissão do *T. cruzi* ocorre principalmente por hematofagia oral, sendo encontrada também fora das zonas endêmicas, onde há a presença de imigrantes oriundos das regiões endêmicas. Apesar de apresentar menor relevância epidemiológica, há também à transmissão acidental em laboratórios e a infecção congênita (Adaptado da WHO, 2010, disponível em http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/).

A transmissão natural ocorre através de vetores triatomíneos (“barbeiros”) durante o ato da sucção do sangue, quando os insetos vetores depositam na pele as formas tripomastigotas metacíclicas juntamente com as fezes. Além disso, a lesão formada pelo triatomíneo na pele do indivíduo promove irritação; este, ao coçar o local da picada, transfere para o orifício formado pela trompa sugadora do triatomíneo as formas metacíclicas que penetram no seu organismo e que iniciam o processo de infecção. Além desta via, destacaríamos as vias de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, infecção por acidente de laboratório, a via transplacentária e ainda a via oral, por ingestão de alimentos contaminados com parasitas de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi* (Rey, 1991; Yoshida, 2008; Moncayo e Silveira, 2009; Pereira, 2009).

A infecção pelo *T. cruzi* depende de diferentes características relacionadas ao parasita, envolvendo tropismo, constituintes antigênicos, carga parasitária, morfologia, virulência, patogenicidade e ainda, aquelas relacionadas ao hospedeiro, como por exemplo; constituição genética, sexo, resistência natural e resposta imune (Macedo, 2002; de Freitas, 2006). No seu conjunto, esses fatores determinam a intensidade com que esta patologia irá se desenvolver, modulando direta ou indiretamente as fases da doença (Coura e Dias, 2009).

1.6 Imunopatologia da doença de Chagas

1.6.1 Fases da doença de Chagas

Fase Aguda → Adquirida à infecção pelo hospedeiro definitivo, a fase aguda da doença de Chagas (durando 30-90 dias), caracteriza-se pela grande concentração de parasitas circulantes e parasitismo celular (Boscardin, 2010). Já na fase aguda da infecção é observada intensa ativação do sistema imune, incluindo altos níveis plasmáticos de citocinas, intensa ativação de células T e B, linfadenopatia, esplenomegalia e intenso processo inflamatório, associado com ninhos do parasita no tecido hospedeiro (Vago, 1996; Gutierrez, 2009). A fase aguda é seguida pelo desenvolvimento de efetiva imunidade adquirida que resulta nos controles da parasitemia e do parasitismo tecidual.

A evolução habitual da fase aguda dá-se no sentido da cura aparente, desencadeando uma fase crônica que pode ser assintomática e durar em média de

20 a 30 anos. No entanto, 20-30% dos indivíduos assintomáticos desenvolvem miocardiopatia de intensidade variável (Higuchi, 1987; Gutierrez, 2009), e entre 8-10% desenvolvem a forma digestiva, caracterizada por dilatação do esôfago e ou cólon. Por outro lado, 50-60% dos pacientes continuam assintomáticos por longo período de vida e são considerados como indeterminados, muito embora apresentem sorologia positiva e raros parasitas circulantes (Fae, 2008; Gutierrez, 2009; Rassi, 2010). É interessante notar que técnicas mais refinadas, utilizadas na análise de tecidos de pacientes assintomáticos, revelaram a presença de focos inflamatórios, associados à presença do parasita (Anez, 1999).

Fase crônica → Do ponto de vista clínico, indivíduos chagásicos crônicos sintomáticos podem ser classificados como: cardíacos e digestivos. Nos indivíduos cardíacos, foi verificado que a presença e o número de parasitas estão associados com sítios de inflamação no coração e diretamente ligados à severidade da doença (Jones, 1993; Gutierrez, 2009). Na forma digestiva é observado processo de denervação da musculatura lisa que reveste o intestino, com dilatação posterior de estruturas esofagianas e intestinais, determinando mega-síndromes (Vago, 1996). Esses indivíduos apresentam dificuldade de deglutição e importante constipação intestinal (Coura e Borges-Pereira, 2010).

A fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, parece ser um balanço entre a construção de uma eficiente resposta imune adaptativa e a presença de poucos parasitas no tecido hospedeiro. Este balanço pode resultar em uma longa forma assintomática da doença de Chagas, porém, por razões ainda não conhecidas, a geração de distúrbios no sistema imune, favorece a replicação do parasita e a (Vago, 1996) manifestação da doença crônica (Jones, 1993).

Além disso, tem sido relatada na fase crônica da doença de Chagas a existência de eventos autoimunes por reação cruzada contra o *T. cruzi*, afetando diferentes tecidos celulares do hospedeiro (Kierszenbaum, 1999; Tarleton, 2003). Vários resultados têm demonstrado que células musculares cardíacas, células endoteliais cardíacas e neurônios, são reconhecidos por soros de indivíduos infectados (Cunha-Neto, 1995). Para melhor compreender estes achados, a análise de antígenos do parasita no hospedeiro, foi relevante para estabelecer a correlação existente entre o *T. cruzi* e infiltrados inflamatórios na doença de Chagas humana (Castro, 2005). Ainda com relação à infecção humana, foi verificado o fenótipo das células formadoras do infiltrado inflamatório na miocardite chagásica crônica, tendo

sido demonstrado que 96% das células do infiltrado inflamatório eram compostas por linfócitos T, e que nestes, a distribuição do fenótipo CD8⁺ foi de 14%, e 11% para linfócitos CD4⁺, e que, além disso, em 58% dos pacientes, foi detectada a presença de antígenos do *T. cruzi* (Fuenmayor, 2005). Da mesma forma, foi evidenciada a presença de macrófagos que expressavam TNF- α , representando 2,6 a 8,1% do total de células na lesão cardíaca (Higuchi Mde, 1993). É possível que tais demonstrações corroborem a relação existente entre a formação do infiltrado inflamatório e a presença do parasita na intensidade da miocardite chagásica humana.

O timo é um órgão-alvo do *T. cruzi*, como observado particularmente na infecção de TEC. A infecção no timo é capaz de promover distúrbios na migração e na viabilidade dos timócitos. Interessante que essas evidências são destacadas durante a fase aguda da doença de Chagas, razão que nos levou a investigar no presente trabalho parte dos mecanismos que regulam as interações entre TEC/timócitos mediadas por ECM, assim como a depleção de timócitos por apoptose. Portanto, é no contexto da infecção experimental aguda pelo *T. cruzi* que resolvemos destacar algumas características relacionadas à resposta imune e que comentaremos a seguir.

1.7 Resposta imune na infecção experimental pelo *T. cruzi*

Logo após entrar em contato com o tecido hospedeiro, o *T. cruzi* desencadeia intensa ativação policlonal mediada por linfócitos T e B. Resumidamente, na tentativa de controlar a infecção durante seu estágio inicial, células apresentadoras de antígeno, tais como macrófagos e células dendríticas, aumentam sua produção de IL-6 (interleucina-6), IL-1 β (interleucina-1 beta), TNF- α (fator de necrose tumoral), IL-12 (interleucina-12) e óxido nítrico (NO). Células *natural killer* (NK) são ativadas por IL-12 a produzir fatores citotóxicos tais como perforina-1 e granzimas, que atuarão contra o parasita e contra células parasitadas. Por outro lado, antígenos parasitários estimulam células B oriundas do baço e dos linfonodos a proliferar, produzindo anticorpos contra o parasita, sendo este evento dependente da produção de IL-6 e IL-4 secretadas por linfócitos T com padrão Th2. Este processo quando exacerbado, resulta na geração de hipergamaglobulinemia, como observado no soro de pacientes e modelos experimentais infectados (d'Imperio Lima, 1986; Minoprio, 1986a; Minoprio, 1987).

Nesse contexto, verificou-se que a ativação policlonal observada no início da doença de Chagas é dependente de antígenos produzidos pelo *T. cruzi*. Foi demonstrado no curso da infecção chagásica humana que DNA derivado do parasita, possui atividade mitogênica para linfócitos B, e que além disso, seja importante na secreção de IL-12, TNF- α e óxido nítrico por macrófagos (Shoda, 2001; Brown e Corral, 2002).

Adicionalmente a ativação policlonal de células B, na doença de Chagas humana foi demonstrada uma variação na frequência de células CD4⁺V β 5⁺. Foi observada modulação negativa no tecido sanguíneo de indivíduos na fase aguda, entretanto sua distribuição estava aumentada em pacientes cronicamente infectados, mostrando uma expressão diferencial do segmento V β do TCR, dependendo do estágio da doença (Costa, 2000). Na infecção experimental aguda em camundongos C57BL/6, a análise do segmento V β em linfócitos periféricos T CD4⁺ não estava modificada. Entretanto, intensa ativação policlonal foi observada em linfócitos T CD8⁺ expressando os segmentos V β 5 e V β 14. Esses achados foram também verificados em camundongos C3H/HeJ e BALB/c, indicando intensa atividade de linfócitos T CD8⁺ no curso da infecção aguda pelo *T. cruzi* (Leite-de-Moraes, 1994). Ainda no modelo murino, a *trans*-sialidase (TS), uma glicoproteína de superfície do *T. cruzi* isoladamente foi capaz de induzir ativação e proliferação de células T CD4⁺ *in vivo*, como também, estimulou células naive T CD4⁺ em ensaios *in vitro*. Nas células T CD4⁺ oriundas de animais infectados, exacerbou sua atividade mitogênica e preveniu a morte celular induzida por ativação (AICD) (Todeschini, 2002).

TS do *T. cruzi* também é alvo de células T CD8⁺. Foi evidenciado que epítopos da família de proteínas da *trans*-sialidase geram respostas mediadas por células T CD8⁺ antígeno-específico, podendo ser variáveis de acordo com a cepa do parasita, sendo mantidas durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* como um mecanismo de escape ao sistema imune e manutenção do parasita (Martin, 2006).

Em conjunto a atividade desses diferentes tipos celulares durante os estágios iniciais da infecção por um lado, garante resistência ao hospedeiro, como também regulam a ativação de clones autorreativos favorecendo a formação de eventos autoimunes, como observado na miocardite (Krettli e Brener, 1976; Brener e Gazzinelli, 1997; Golgher e Gazzinelli, 2004). Além disso, tem sido proposto que a ativação policlonal inicial do sistema imunológico serve como um mecanismo de

evasão do parasita para dispersar a resposta imune, dificultando o desenvolvimento de uma resposta específica contra antígenos do parasita (Minoprio, 2001).

No contexto da geração da resposta imune durante a fase aguda da doença de Chagas, é observada produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e ativação de componentes da imunidade inata como células NK (Hatcher, 1981) macrófagos (Ortiz-Ortiz, 1976) e células dendríticas (Bafica, 2006), conjuntamente com ativação policlonal de células T e B (Minoprio, 1986a). Entretanto, é importante destacar a habilidade do parasita em ativar o fator de transcrição NF- κ B como determinante para garantir sua sobrevivência e tropismo ao tecido hospedeiro (Hall, 2000). Receptores com padrão de reconhecimento, capazes de ativar a via de transcrição do NF- κ B, tais como receptores *toll* (TLRs), são cruciais para montagem da imunidade inata e geração da imunidade adquirida. Citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IL-27 e TNF- α são secretadas e ativam outras células inflamatórias (Michailowsky, 2001; Bilate, 2008). Animais que são deficientes para o sinal via TLRs (MyD88), são impedidos de produzir citocinas inflamatórias, tornando-se altamente susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi*, apresentam alta parasitemia e mortalidade, sugerindo que a resistência a infecção aguda é em parte dependente da sinalização via TLR (Campos, 2004; Bafica, 2006). Entretanto, dados da literatura demonstram que a maioria dos TLRs leva a resposta do tipo Th1 (linfócitos T helper-1) (Schnare, 2001).

Em outros experimentos, foi demonstrado que antígenos parasitários como glicosilfosfatidilinositol (GPI), se mostram significativamente presentes na membrana do parasita, exercendo atividade imunoregulatória. GPI é reconhecido pelos receptores transmembranares TLR-2. Entretanto, camundongos deficientes para TLR-2 quando infectados, produzem citocinas pró-inflamatórias, ainda que a parasitemia e a mortalidade não sejam diferentes quando comparadas ao animal selvagem (Campos, 2004). Além disso, GPI é reconhecido pela via TLR-4, sendo que animais deficientes para TLR-4 são mais susceptíveis a infecção que animais selvagens (Campos e Gazzinelli, 2004). É importante destacar que GPI são potentes indutores da produção de óxido nítrico por macrófagos primados por INF- γ , como demonstrado por Camargo e Colaboradores (Camargo, 1997). Esse mesmo grupo identificou TLR-2 como um receptor funcional, relacionado na produção de IL-12, TNF- α e óxido nítrico (Campos, 2001). Foi demonstrado também que a ligação do *T. cruzi* com TLR-9 estimula macrófagos e células dendríticas a secretar IL-12, TNF- α e óxido nítrico (Shoda, 2001). De fato, camundongos deficientes quanto à expressão

de TLR-9, são mais susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi*, além disso, alguns resultados sugerem que TLR-2 e TLR-9, cooperam para controlar a replicação do parasita durante a fase aguda da infecção (Bafica, 2006). Tomados em conjunto, esses achados sugerem um relevante papel para a sinalização *via* TLR, particularmente no reconhecimento do parasita, na produção de citocinas, na regulação do dano tecidual resultante da reação inflamatória nos tecidos cardíaco e digestivo infectados e conseqüentemente na geração da imunidade inata e adaptativa geradas durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* (Junqueira, 2010). Além disso, a natureza genética do hospedeiro é relevante para indicar sua resistência ou susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (Campbell, 2004). Dessa forma, foi evidenciado que enquanto no camundongo BALB/c a infecção resultou em significativa produção de IL-4 por células T CD3⁺ da cavidade peritoneal, no camundongo C57BL/6 em contrapartida, as mesmas células produziam mais INF- γ . Adicionalmente, foi verificado que macrófagos isolados do baço de camundongos C57BL/6 infectados produziam mais óxido nítrico, quando comparados aos macrófagos isolados do camundongo BALB/c (Planelles, 2003).

De fato, na montagem da resposta imune contra o parasita, células T, macrófagos e células dendríticas podem ser diferencialmente ativadas, sendo as quimiocinas moléculas aptas para influenciar sua ativação. Dessa forma, foi demonstrado que quimiocinas tais como, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10 estimulam a migração de células T produtoras de INF- γ para o tecido infectado (Teixeira, 2002; Bilate e Cunha-Neto, 2008). É importante destacar que CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES, induzem a produção de óxido nítrico por macrófagos humanos de forma semelhante ao IFN- γ , sendo esta produção crucial para lise do *T. cruzi* (Villalta, 1998). Entretanto, neutralização *in vivo* de CCL3, diminuiu de forma significativa a frequência de macrófagos no baço de camundongos infectados na fase aguda da doença, porém por outro lado, aumentou o fluxo no miocárdio, indicando que a dinâmica de parte das células envolvidas com a imunidade inata, está sob controle das quimiocinas (Petray, 2002).

Estudos adicionais mostram que além dos tipos celulares clássicos requeridos na imunidade inata, cardiomiócitos são ativamente integrados na resposta inflamatória observada durante a infecção pelo *T. cruzi*. Foi demonstrado, que tecido cardíaco coletado de ratos e camundongos infectados, expressavam IL-6, IL-1 β , TNF- α e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Zhang e Tarleton, 1996a;

Chandrasekar, 1998). Além disso, verificou-se em ensaios *in vitro* que cardiomiócitos infectados pelo parasita também expressavam mRNA para TNF- α , IL-1 α e iNOS, assim como CXCL3/MIP-2 β e CCL5/RANTES (Machado, 2000; Fichera, 2004). É importante destacar que a capacidade de cardiomiócitos em produzir óxido nítrico em culturas infectadas pelo *T. cruzi*, está diretamente relacionada ao tratamento prévio destas culturas por citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α e INF- γ (Fichera, 2004).

Em adição a ativação de cardiomiócitos, foi demonstrado no modelo murino uma possível correlação entre a modulação de moléculas da ECM, a atividade enzimática de metaloproteinases (MMP) e a miocardite observada durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* (Tsuruda, 2004). Além disso, foi demonstrado que o reconhecimento de antígenos depende do tráfego celular, da produção local de citocinas e quimiocinas, da regulação positiva de seus receptores e moléculas de adesão (Laucella, 1996; Lannes-Vieira, 2003). Diferentes autores associam a formação de sítios de inflamação com a presença física do parasita no coração e no esôfago (Jones, 1993; Vago, 1996).

Utilizando ensaios de imunofluorescência com anticorpos anti-ECM em cortes de coração de camundongos infectados, foi verificado um aumento de fibronectina e laminina presentes na fase aguda (26-30 dias pós-infecção), assim como laminina e colágeno do tipo IV no início da fase crônica (50-90 e 80-90 dias pós-infecção respectivamente), sendo que, no estágio tardio da infecção (150-200 dias pós-infecção) foi evidenciada marcação de laminina, fibronectina e colágenos dos tipos III e IV. Foi notada ainda uma aparente correlação entre modulação das moléculas de ECM e a presença de células inflamatórias (Andrade, 1989). Essas moléculas estariam relacionadas com a evolução da fibrose cardíaca nas diferentes fases da infecção. De fato, a fibrose cardíaca em indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* é um dos fatores mais importantes da forma crônica da doença de Chagas (Gutierrez, 2009).

Outros estudos vêm sendo realizados para melhor entender a imunopatologia da doença de Chagas. Foi evidenciada a expressão de componentes de ECM e seus respectivos receptores no sistema nervoso central de camundongos agudamente ou cronicamente infectados, verificando-se importante modulação da expressão da fibronectina e seus receptores VLA-4 e VLA-5 nas células inflamatórias. Além disso, detectou-se aumento da laminina na lâmina basal dos

vasos sanguíneos (Silva, 1999; Correa-de-Santana, 2006a). Estes resultados tomados em conjunto sugerem que elementos de ECM e seus receptores também estejam envolvidos na entrada, migração e retenção de células inflamatórias no sistema nervoso central e no coração de camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

O mecanismo de destruição do tecido cardíaco mediado por células tem sido motivo de inúmeras discussões. No estágio inicial da infecção, células T CD4⁺ são o subtipo predominante, entretanto em seguida, linfócitos T CD8⁺ logo aparecem predominando no processo inflamatório. Ambas são caracterizadas como células CD62L^{low}, LFA-1^{high} e VLA-4^{high}, indicando que sejam células mais ativadas (Talvani, 2000; dos Santos, 2001). É importante destacar que linfócitos T CD8⁺ têm sido mostrados por possuir um papel primário no controle da replicação do parasita no tecido cardíaco de camundongos (Tarleton, 1992; Tarleton, 1994). Entretanto, o aparecimento de células T no processo inflamatório parece ser relevante na gênese de eventos autoimunes. Nesse contexto, foi observado na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* que células CD4⁺ reconhecem miosina e não actina (Rizzo, 1989; Leon, 2001). Uma teoria em favor de um mecanismo de autoimunidade na miocardite chagásica foi proposta em experimentos com transplante de coração de camundongos isogênicos neonatos na orelha de camundongos da mesma linhagem (Ribeiro-dos-Santos, 1991). Foi observado que em camundongos normais, os transplantes permaneciam viáveis por um longo período. Quando o camundongo receptor era cronicamente infectado pelo *T. cruzi*, observou-se severa rejeição do coração transplantado. Nesses experimentos, as células efetoras foram identificadas como linfócitos T CD4⁺. Além disso, foi verificado que a transferência de células CD4⁺ obtidas de camundongos chagásicos crônicos para animais com transplantes singênicos foi capaz de desencadear um processo de rejeição nos corações transplantados, sendo este efeito bloqueado por tratamento do enxerto com anticorpo anti-VLA-6 (receptor para laminina) (Silva-Barbosa, 1997).

Entretanto, Tarleton e Zhang discordaram desses achados, sustentando a hipótese de que uma inflamação grave ocorre somente quando o parasita foi diretamente injetado no transplante, mostrando que o *T. cruzi*, e não um processo autoimune, seria responsável pelo efeito observado nos experimentos com coração transplantado de camundongo neonato (Zhang e Tarleton, 1996b). É interessante notar que o processo inflamatório é atenuado no coração de animais infectados

quando estes são deficientes para INF- γ , apesar do elevado número de parasitas (Aliberti, 2001; Michailowsky, 2001).

Outros achados sustentam que o controle da hiperatividade do sistema imune é aparentemente necessário para prevenir efeitos deletérios ao tecido hospedeiro. Em animais deficientes para IL-10, foi verificado significativo aumento na secreção de TNF- α , IL-12 e IFN- γ . Embora apresentassem parasitemia reduzida, desenvolviam reação inflamatória intensa que levava a morte desses animais, enquanto no grupo controle a parasitemia era menor e sua sobrevivência era significativamente maior, sugerindo que IL-10 é requerida para controlar em parte a atividade exacerbada do sistema imune durante a infecção pelo *T. cruzi* (Hunter, 1997).

Adicionalmente, estudos com ratos deficientes para IL-10, mostraram que a causa da morte desses animais quando infectados pelo *T. cruzi*, foi diretamente relacionada com a produção de TNF- α , sugerindo que esta citocina foi mediadora da síndrome do choque tóxico (perda de peso, hipotermia, hipoglicemia, hipercalemia, aumento do fígado, juntamente com necrose hepática e coagulação intravascular) (Holscher, 2000). Do mesmo modo, animais deficientes para IL-4 cronicamente infectados, mostraram significativa resposta Th1 e intensa miocardite, embora apresentassem baixo parasitismo tecidual (Soares, 2001).

É importante destacar que o mRNA para IL-4 e IL-10 já estão expressos no coração de animais infectados (15 dias pós-infecção), indicando que citocinas imunoreguladoras podem estar agindo desde o início do processo inflamatório, sendo que o êxito para o controle da resposta Th1 só é visto em torno de 60 dias pós-infecção (Talvani, 2000; dos Santos, 2001).

Uma importante questão abordada dentre os inúmeros mecanismos imunoregulatórios observados durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, é que esses mecanismos poderiam ser relevantes para escape do parasita frente ao sistema efetor, favorecendo a sobrevivência do hospedeiro e o estabelecimento da infecção crônica. Neste contexto, TGF- β e IL-10 têm sido mostrados modulando a função efetora de macrófagos, como observado na produção de óxido nítrico e na morte do parasita por macrófagos ativados por INF- γ (Silva, 1991; Silva, 1992; Freire-de-Lima, 2000). Por outro lado, a atividade de macrófagos pode ser modulada, como observado na fagocitose de corpos apoptóticos linfocitários. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, inibe sua produção de óxido

nítrico e conseqüentemente sua capacidade de matar o parasita (Lopes, 1999; Freire-de-Lima, 2000).

A indução da morte celular por apoptose tem sido descrita como relevante para o controle da estimulação de linfócitos T e B durante a infecção pelo *T. cruzi*, (Lopes, 1995; Freire-de-Lima, 2000; Zuniga, 2002), podendo ser induzida por diferentes mecanismos, dependente ou não de óxido nítrico e ou Fas (CD95) (Lopes, 1999; Martins, 1999; Martins, 2001). Nesse contexto, na infecção experimental pelo *T. cruzi*, células T CD8⁺ estão relacionadas com a morte de células parasitadas por apoptose, através da produção de perforina e granzima B ou através da via extrínseca de indução de morte por atividade de caspases mediada pelo receptor Fas e seu ligante FasL (CD178). Entretanto, não foi observado aumento da susceptibilidade a infecção em animais deficientes para perforina e granzima (Kumar e Tarleton, 1998). Contrariando esta hipótese, foi demonstrado que animais sem perforina e granzima B são mais susceptíveis à infecção com a cepa Tulahuén do *T. cruzi*, sendo esta susceptibilidade também relacionada à deficiência de Fas/Fas-L (Muller, 2003). Esses achados foram corroborados na infecção de camundongos *gld/gld* pela cepa Dm28c do *T. cruzi* (Lopes, 1999). Em nosso laboratório demonstramos que a morte celular modificou a celularidade observada em órgãos linfóides periféricos de camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Verificamos severa atrofia dos linfonodos mesentéricos por significativa morte de linfócitos por apoptose, fato não observado nos linfonodos subcutâneos que ao contrário, apresentavam importante aumento da celularidade, indicando uma resposta imune regional diferencial (de Meis, 2006).

No contexto da resposta imune regional, estudos relacionados ao timo mostram que este é um órgão-alvo à infecção pelo *T. cruzi*, tendo em vista a detecção de formas amastigotas no parênquima tímico (Savino, 1989; Da Costa, 1991). Foi revelada também uma destacada redução da região cortical e densificação da rede epitelial do órgão. Utilizando-se um painel de anticorpos dirigidos contra diferentes citoqueratinas, mostrou-se ainda que a infecção modificou o padrão fenotípico do microambiente tímico. Foi verificado, por exemplo, que células CK8⁺/18⁺, normalmente restritas à região cortical, passam a ser detectadas também na medula tímica. Além disso, foi observada uma autorreatividade contra-TEC, pela demonstração da presença de anticorpos em animais na fase aguda da infecção chagásica (Savino, 1989). Na fase crônica da doença foram encontrados

anticorpos anti-timócitos que reconhecem de forma cruzada antígenos do *T. cruzi* (Savino, 1990). Com estes achados, acredita-se na ocorrência do evento de mimetismo molecular entre epítomos do parasita e componentes de células tímicas normais (Savino, 1990; Savino, 1992).

Adicionalmente, a infecção tímica pelo *T. cruzi* resulta em aumento da expressão de moléculas de ECM como fibronectina, laminina e colágeno tipo IV, assim como o aumento na densidade de moléculas de MHC de classe II. Resultados obtidos em nosso laboratório sustentam que o aumento de moléculas de ECM é acompanhado pelo aumento da expressão de seus receptores, VLA-4 e VLA-5 (receptores de fibronectina) e VLA-6 (receptor de laminina), sugerindo uma possível ocorrência de distúrbios migratórios (Cotta-de-Almeida, 2003).

De fato, um conjunto de experimentos sustenta que o *T. cruzi* é capaz de modificar os padrões fisiológicos das células *nurse* tímicas (TNC) (Cotta-de-Almeida, 1997). As TNC compreendem um complexo linfoepitelial, onde uma célula epitelial é capaz de abrigar variado número de timócitos, particularmente àqueles expressando fenótipo DP (Wekerle e Ketelsen, 1980; Wekerle, 1980; Villa-Verde, 2002). Foi observada diminuição no número e tamanho de TNC quando isoladas de camundongos infectados, sendo este evento relacionado a apoptose de timócitos imaturos mediada pela *trans*-sialidase secretada pelo parasita. Além disso, as TNC isoladas de animais infectados demonstraram maior capacidade em liberar timócitos que aquelas isoladas de camundongos normais. Resultados semelhantes foram também observados *in vitro*. É interessante notar que as TNC isoladas de animais infectados tinham seu padrão de expressão de ligantes e receptores da ECM aumentados (Cotta-de-Almeida, 1997; Mucci, 2002).

Considerando que as TNC abrigam majoritariamente timócitos imaturos, poder-se-ia imaginar que a capacidade migratória desses timócitos estaria modificada na infecção de camundongos pelo *T. cruzi*. Uma evidência em favor dessa hipótese mostrou que a migração anormal de timócitos em animais infectados pelo *T. cruzi*, foi observada em experimentos onde a migração estimulada pela fibronectina (FN) foi significativamente aumentada em células DP isoladas de camundongos infectados (Cotta-de-Almeida, 2003).

Está demonstrado que quimiocinas também participam na migração de timócitos (Norment e Bevan, 2000; Annunziato, 2001), estando também em associação com ECM (Pelletier, 2000). Resultados do nosso laboratório indicam que

FN e laminina (LM) aumentam a atividade quimiotática de CXCL12 para timócitos DP *in vitro*, sugerindo que tal interação é importante na migração e desenvolvimento de timócitos (Savino, 2002; Savino, 2004). No contexto da infecção pelo *T. cruzi*, foi observado aumento na deposição intratímica de CXCL12, com aumentada co-expressão da FN. Resultados semelhantes foram observados quanto à expressão de CCL4 no timo de animais infectados.

Em conjunto com os padrões aumentados de quimiocinas, timócitos isolados de animais infectados, apresentaram significativa densidade membranar dos receptores CXCR4 e CCR5, (respectivamente receptores para quimiocinas CXCL12 e CCL4) particularmente na subpopulação de timócitos imaturos DP. Considerando o aspecto funcional da modulação positiva dos receptores para quimiocina estudados, foi verificado que a alta densidade desses receptores em timócitos isolados de animais infectados resultou em maior capacidade de migrar que aqueles isolados dos animais normais, não infectados. Esses dados foram corroborados, particularmente nos ensaios onde CXCL12 foi adicionado como um quimioatraente. Adicionalmente, tratamento combinatório entre CXCL12 e FN, resultou em importante sinergismo na migração de timócitos DN e DP, sendo esta resposta correlacionada com a aumentada expressão dos receptores CXCR4 e receptores da FN, (particularmente VLA-4) durante a infecção pelo *T. cruzi* (Mendes-da-Cruz, 2006).

Com relação ao repertório de timócitos em animais chagásicos, apesar de ter sido verificado um aumento no percentual de células DP $V\beta 5^+$ e DP $V\beta 12^+$, não foram observadas células simples positivas $CD4^+CD8^-V\beta 5^+$ e $CD4^+CD8^-V\beta 12^+$ expressando esses segmentos no timo, sugerindo que os processos seletivos estariam ocorrendo normalmente. Sustentando esta hipótese, a ocorrência de alterações no repertório de células T, durante o curso da infecção, também foi observada em órgãos linfóides periféricos de camundongos. De fato, foi verificada a presença de células imaturas DP nos linfonodos subcutâneos e baços de camundongos infectados pelo *T. cruzi* (Cotta-de-Almeida, 2003) e ainda do mesmo modo, foi demonstrada a presença de “clones proibidos” ($v\beta 5$ e $v\beta 12$) que deveriam ser deletados no timo, em órgãos linfóides periféricos (Mendes-da-Cruz, 2003). Corroborando esses achados, na análise de recentes emigrantes tímicos em camundongos, células com fenótipo DP isoladas do baço e linfonodos subcutâneos durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, apresentaram significativo aumento

no mRNA para TNF-R1 e TNF-R2, indicando que as alterações na migração de timócitos durante a fase aguda da infecção, são em parte favorecidas pelo TNF- α (Perez A. R. Submetido à PLoS ONE - 2011)

Na severa atrofia do órgão, observada durante o curso da infecção experimental aguda, podem ser destacadas significativas modificações no compartimento linfóide. De fato, quando camundongos foram experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*, desenvolviam progressiva atrofia do timo com intensa morte celular, particularmente de timócitos imaturos com fenótipo DP (Savino, 1989; Leite de Moraes, 1991; Cotta-de-Almeida, 2003). Importante destacar que a atrofia do timo por morte celular ocorre progressivamente, paralelamente aos aumentos da parasitemia e dos níveis de citocinas pro-inflamatórias. Nesse contexto, vários mecanismos estão relacionados à depleção de timócitos durante a fase aguda da infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi*, incluindo a morte por apoptose.

Foi demonstrada importante correlação entre a diminuição da celularidade observada no timo de animais agudamente infectados e a presença de corpos apoptóticos na região cortical do timo (Savino, 1989), entretanto, os mecanismos envolvidos na depleção de timócitos por apoptose, ainda não foram claramente investigados. Foi evidenciado, por exemplo, que durante a infecção há uma intensa reação inflamatória mediada por TNF- α que ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por citocinas proinflamatórias como IL-1 e IL-6 causando aumento na produção de glicocorticóides, influenciando na viabilidade de timócitos (Perez, 2007). Corroborando esses achados, há evidências na literatura, demonstrando que a produção de corticóides pelas células epiteliais tímicas influenciaria no processo de morte de timócitos por apoptose (Jondal, 2004; Cole, 2005). Em camundongos C3H/HeJ, infectados com cepa CL do *T. cruzi*, a adrenalectomia desses animais não inibiu a depleção de timócitos (Leite de Moraes, 1991). Apesar disso, foi revelado que em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Tulahuén, a inibição da ação da corticosterona, preveniu parcialmente a depleção maciça de timócitos DP (Roggero, 2006).

Adicionalmente, estudos direcionados à morte de timócitos por apoptose em camundongos *gld/gld* revelou que a atrofia tímica no modelo murino durante o curso da infecção aguda pelo *T. cruzi*, ocorre independente da interação Fas/FasL ou da Perforina (Henriques-Pons, 2004).

Galectina-3 também está envolvida na migração de timócitos, estando também aumentada no timo de animais infectados e em culturas de células epiteliais tímicas infectadas *in vitro*. A análise do timo de camundongos deficientes para galectina-3 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, demonstrou bloqueio da atrofia tímica, indicando que esta proteína que se liga a carboidratos, exerce relevante papel na depleção de timócitos, durante o curso da infecção aguda (Silva-Monteiro, 2007). É importante destacar que o *T. cruzi* se liga a galectina-3 para aderir a laminina, sendo este evento crucial para infecção (Moody, 2000; Kleshchenko, 2004).

De fato, a manutenção do parasita no hospedeiro é um indicativo de que produtos parasitários estariam envolvidos com a morte de timócitos por apoptose. Neste contexto, observamos que quando camundongos foram tratados por benzonidazol, uma droga avaliada para tratamentos clínicos na infecção pelo *T. cruzi* (Caldas, 2008), houve significativa redução da parasitemia que ocorria em conjunto com a inibição da morte de timócitos por apoptose (Olivieri, 2005). Corroborando esses dados, Mucci e colaboradores, observaram que a apoptose verificada em células TNC de animais infectados, é reproduzida em culturas tratadas por *trans*-sialidase, uma enzima derivada do parasita (Mucci, 2002).

ATP extracelular também tem ação pro-apoptótica envolvida na morte de timócitos. Foi observado que o ATP induz um aumento na permeabilização da membrana celular, particularmente nas células DP de animais infectados, facilitando o fluxo de cálcio através dos receptores P2Z/P2X7, resultando na morte dessas células por apoptose (Mantuano-Barradas, 2003).

Tomados em conjunto, os dados descritos anteriormente indicam que, a migração e morte de timócitos durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* está sob diferentes estímulos, envolvendo produtos oriundos do parasita e do tecido hospedeiro, entretanto os mecanismos relacionados a tais eventos ainda precisam de estudos mais detalhados. Assim, na infecção experimental pelo *T. cruzi* decidimos por um lado investigar os possíveis distúrbios na capacidade de TEC em interagir com timócitos e, por outro lado, analisar os mecanismos que governam a morte de timócitos por apoptose, analisando as vias indutoras de ativação de caspases. Além disso, pretendemos avaliar a importância do timo no curso da infecção aguda, analisando a participação do timo na composição da celularidade em órgãos linfóides secundários de animais timectomizados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar distúrbios de migração e morte de timócitos na infecção experimental aguda pelo *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos:

- 1) Definir a celularidade encontrada no timo, linfonodo subcutâneo, linfonodo mesentérico e baço, em animais infectados pela cepa Tulahuén do *T. cruzi*.
- 2) Estudar a importância do timo na dinâmica de populações linfocitárias de órgãos linfóides periféricos durante a fase aguda da infecção chagásica experimental.
- 3) Verificar *in vitro* se a infecção de células epiteliais tímicas (TEC) resulta na alteração de padrões fisiológicos das TEC tais como, morfologia e expressão de componentes da matriz extracelular e seus receptores e sua capacidade de promover adesão de timócitos.
- 4) Analisar a proliferação e morte celular no compartimento epitelial tímico após infecção pelo *T. cruzi*.
- 5) Investigar as vias indutoras da morte de timócitos, observadas na atrofia tímica no curso da infecção experimental aguda pelo *T. cruzi*.
- 6) Verificar se o tratamento *in vitro* e *in vivo* com inibidores de caspases, inibem a morte de timócitos após infecção aguda pelo *T. cruzi*.

3 DOCUMENTO 1

Differential Regional Immune Response in Chagas Disease

de Meis J, Morrot A, Farias de Oliveira DA, Villa-Verde DMS, Savino W. PLoS Neglected Tropical Disease (2009) 3(7): e417.

Neste trabalho, relacionado aos objetivos específicos 1 e 3 analisamos o comportamento de órgãos linfóides central (timo) e periféricos (linfonodos subcutâneos, mesentéricos e baço) após infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Nesse sentido, revisamos os estudos que apontam para a importância dos processos de migração e morte celular na dinâmica linfocitária encontrada em cada tecido durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*.

Apesar de ser um artigo de revisão, estendemos os achados da literatura, trazendo resultados originais no qual demonstramos o comportamento desses órgãos após uma infecção de camundongos BALB/c pela cepa Tulahuén do *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram que assim como outras cepas previamente estudadas, a cepa Tulahuén promove uma importante atrofia do timo por depleção de timócitos DP e também atrofia dos linfonodos mesentéricos. Por outro lado, o baço e os linfonodos subcutâneos apresentaram-se hipertrofiados. Destacamos ainda que células epiteliais tímicas (TEC) são infectadas *in vitro* pelo *T. cruzi*. Por fim, revisamos dados anteriores do nosso grupo demonstrando que a alteração da capacidade migratória de timócitos está relacionada com o aumento na produção de componentes da matriz extracelular, tais como fibronectina e laminina.

4 DOCUMENTO 2

Thymus atrophy and double positive escape are common features in infectious diseases.

Manuscrito aceito para publicação em Journal of Parasitology Research.

de Meis J, **Farias-de-Oliveira DA**, Nunes Panzenhagen PH, Maran N, Villa-Verde DMS, Morrot A, Savino W (2011). No prelo.

Neste trabalho, relacionado aos objetivos 1 e 2 revisamos dados recentes relacionados à atrofia do timo, em particular naquela observada na infecção pelo *T. cruzi*. Discutimos que a atrofia está relacionada à morte por apoptose e a distúrbios na migração de timócitos que geram importante depleção de células imaturas DP, trazendo conseqüências na geração da resposta imune. Mostramos ainda que a timectomia gerou exacerbada população de esplenócitos em animais infectados, indicando que o timo exerce papel imunoregulatório na celularidade do baço desses animais. Adicionalmente, discutimos que as alterações observadas nas células DP, poderiam representar um marcador clínico na progressão de doenças infecciosas, favorecendo o desenvolvimento de prognóstico.

5 DOCUMENTO 3

Fibronectin modulates the infection of thymic epithelial cells by the protozoan *Trypanosoma cruzi*.

Manuscrito em preparação

Farias-de-Oliveira DA, Cotta-de-Almeida V, Villa-Verde DMS, Riederer I, de Meis J, Savino W (2011).

Este artigo refere-se aos objetivos 3 e 4. Nele, propusemo-nos a estudar a capacidade do *T. cruzi* em modular a produção de ECM por células epiteliais tímicas. Além disso, investigamos se uma possível alteração na expressão de elementos da ECM poderia interferir na interação entre TEC e timócitos. Evidenciamos nas culturas infectadas aumento na deposição de componentes da matriz extracelular, tais como fibronectina, laminina e colágeno do tipo-IV. Revelamos que quando as culturas de TEC foram infectadas, aumentou sua capacidade em interagir com timócitos. Além disso, demonstramos a importância da ECM na infecção de TEC pelo *T. cruzi*. Quando as culturas foram previamente tratadas por elementos da ECM como FN e LM, houve aumento no percentual de células infectadas. Por outro, tratamento com anticorpos anti-ECM inibiu a infecção. Nesse contexto discutimos que as alterações na expressão da ECM em células epiteliais tímicas poderiam ser a origem dos distúrbios migratórios observados no timo de camundongos infectados. Sugerimos ainda que a modulação de ECM por TEC, de alguma forma favoreça a permanência do parasita no microambiente tímico.

6 DOCUMENTO 4

Caspase-8 and caspase-9 activity promotes thymocyte apoptosis and thymus atrophy during acute *Trypanosoma cruzi* infection.

Farias-de-Oliveira DA, Nunes-Panzenhagen PH, dos Santos DS, Berbert LR, Savino W, Villa-Verde DMS, de Meis J (2011).

Este último estudo que compõe a presente tese relaciona-se aos objetivos específicos 5 e 6. Nele, analisamos camundongos que sofreram infecção aguda pela cepa Tulahuén do *T. cruzi*. Nesse contexto, investigamos a celularidade e, revelamos os perfis de células apoptóticas. Procuramos ainda identificar a atividade de caspases nas subpopulações de timócitos revelando as vias indutoras de morte por apoptose. Verificamos também se tratamento com inibidores da atividade de caspases, zVAD-fmk (inibidor geral de caspases), zIETD-fmk (inibidor da caspase-8) e zLEHD (inibidor da caspase-9), seriam relevantes para restaurar a viabilidade celular em timócitos oriundos dos animais infectados. Nossos resultados mostraram importante depleção de timócitos, considerando todas as subpopulações, indicando uma correlação com a morte celular por apoptose. Revelamos intensa atividade das caspases-8 e 9, com diminuição de celularidade nos quatro estágios de diferenciação intratímica definidos pela expressão de CD4 e CD8. Vimos que o tratamento *in vivo* e *in vitro* por zVAD-fmk inibiu a morte de timócitos oriundos de animais infectados. Entretanto, nenhum efeito significativo foi observado no tratamento por inibidores específicos zIETD-fmk e zLEHD-fmk. Interessante que na análise de células do epitélio tímico infectadas no sistema *in vitro*, não identificamos indicativos de morte por apoptose. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que caspases podem ser consideradas como alvo terapêutico no sentido de restaurar e inibir a atrofia tímica após infecção chagásica aguda e conseqüentes distúrbios nos órgãos linfóides periféricos.

7 DISCUSSÃO

Na presente tese, desenvolvemos uma série de experimentos visando a aprofundar os estudos sobre o timo de camundongos submetidos à infecção aguda pelo *T. cruzi*. Inicialmente abordando o compartimento epitelial tímico, ressaltamos o fato de as TEC serem passíveis de infecção tanto *in vivo* como *in vitro* (Savino, 1989; Da Costa, 1991; Cotta-de-Almeida, 1997), o que nos leva a aceitar a hipótese de uma ação direta do parasita sobre o compartimento epitelial tímico. Estendendo esses achados, infectamos a cultura de células epiteliais da linhagem IT-76M1 pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (documento 1, figura 2b). Nesse contexto, nosso objetivo foi compreender se a infecção *in vitro* de TEC resultaria na modulação dos componentes de ECM e seus receptores, e ainda, se esta modulação promoveria distúrbios na interação heterotípica entre as TEC e timócitos, evento que é em parte mediado por ligantes e receptores de ECM (Savino, 2004; Dardenne, 2009).

Analisando as características das culturas de TEC infectadas, observamos que a presença do parasita modificou o aspecto morfológico das culturas, promovendo prolongamentos da membrana celular, particularmente nas células parasitadas (documento 3, figura 1a). Os achados na literatura sugerem que estas características são também encontradas em culturas de células não-fagocitárias infectadas pelo *T. cruzi*. Verificou-se na infecção *in vitro* de células HeLa e Vero, que os prolongamentos da membrana são estruturas ricas em laminina, fibronectina e vitronectina (Procopio, 1999). Como discutiremos mais adiante, demonstramos que culturas de TEC infectadas também apresentam um aumento bastante evidente na expressão de proteínas de ECM.

Cabe salientar que as alterações nos padrões morfológicos em culturas de TEC infectadas ocorreram em paralelo à uma diminuição na capacidade proliferativa dessas células. Esta análise foi possível após observarmos que os espaços intercelulares nas culturas infectadas pareciam ser maiores que nas culturas normais. De fato, após contagem das diferentes preparações de TEC, por exclusão em azul de trypan ou por marcação com BrdU, verificamos que a presença do *T. cruzi* nessas culturas retardou a capacidade proliferativa das TEC (documento 3, figuras 4a e b). É importante ressaltar que a diminuição da celularidade está de fato relacionada à inibição do ciclo e não a morte celular, como revelado nas identificações das TEC marcadas por anexina-V (documento 3, figura 4c).

Entretanto, não sabemos se o efeito inibitório na proliferação das culturas infectadas seja resultante da presença do parasita ou de produtos por ele liberados. Desse modo, seria importante investigar se, mantendo o *T. cruzi* em meio axênico, e em seguida cultivando as TEC neste meio, conseguiríamos reproduzir nossos resultados.

Outro passo neste mesmo trabalho foi investigar se diferentes componentes da ECM em cultivos de TEC, infectadas ou não pelo *T. cruzi*. Verificamos por imunofluorescência indireta, aumento na expressão de fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV, 48 horas após infecção, o que foi confirmado de forma semiquantitativa por ensaio imunoenzimático e imunohistoquímica. Tomados em conjunto nossos resultados indicam que a infecção de TECs pelo *T. cruzi* resulta na modulação da expressão de elementos da ECM, tais como fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV (documento 3, figuras 1a e b).

O envolvimento de moléculas de ECM na interação parasita/célula já foi demonstrado por diferentes autores como facilitador da infecção pelo *T. cruzi*. De fato, foi evidenciado aumento no número de células infectadas quando as culturas da linhagem 3T3 ou o parasita foram previamente tratados por fibronectina (Ouaisi, 1985). Por outro lado, tratamento prévio por anticorpos anti-laminina foi capaz de inibir a infecção (Giordano, 1994). Confirmando a hipótese de que elementos da ECM de fato facilitam a infecção de diferentes tecidos pelo *T. cruzi*, foi demonstrado recentemente que o silenciamento gênico através de interferência do RNA da cadeia γ -1 da laminina em linhagem de adenocarcinoma humano (HeLa) também inibiu em parte a entrada do parasita (Nde, 2006). Esses achados nos levaram a realizar experimentos funcionais, tratando previamente as culturas de TEC com fibronectina, ou por anticorpos bloqueadores anti-fibronectina. Verificamos que quando as culturas de TEC foram tratadas por fibronectina, houve significativo aumento no percentual de células infectadas. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a fibronectina seja importante na interação entre TEC e *T. cruzi* (documento 3, figura 3a).

As diferenças encontradas nos percentuais de infecção após tratamento das culturas da linhagem de TEC IT-76M1, talvez estejam em parte relacionadas à biodisponibilidade de receptores para fibronectina, distribuídos respectivamente, nas membranas do *T. cruzi* e das TEC, e conseqüentemente com a quantidade dessas moléculas utilizadas pelo parasita na sua interação com as TEC.

Os experimentos em que mostramos modulação nos percentuais de infecção, após tratamento das culturas de TEC por anticorpos anti-ECM, confirmam a hipótese discutida anteriormente, visto que, o bloqueio da fibronectina em culturas de TEC e TNC também modulou a entrada do parasita (documento 3, figuras 3a e b). Esses resultados nos levam a acreditar, que talvez haja uma relação ótima da quantidade de ECM expressa pelas TEC, e os receptores disponíveis no parasita.

Conhecendo a participação de ligantes e receptores da ECM na interação TEC/timócitos (Savino, 2003; Ocampo, 2008), decidimos investigar, se estes padrões estariam modificados, quanto ao grau de adesão de timócitos normais, sobre as preparações de TEC, e ainda determinar o fenótipo dos timócitos aderidos. Quando analisamos os experimentos de adesão, observamos que esta foi maior nas culturas de TEC infectadas (documento 3, tabela1). Além disso, verificamos nas culturas infectadas, que houve adesão preferencial dos timócitos sobre as células particularmente parasitadas (documento 3, figuras 2a e b). Embora não tenhamos feito análises adicionais, é possível que a adesão preferencial de timócitos sobre TECs parasitadas, tenha sido reforçada por outras moléculas requeridas na interação TEC/timócitos como LFA-3 e ICAM-1 e seus respectivos receptores CD2 e LFA-2 (Vollger, 1987; Singer, 1990a; Singer, 1990b).

Este conjunto de resultados sugere que a infecção das TEC pelo *T. cruzi* resulte em alterações funcionais, incluindo a capacidade proliferativa. Além disso, a presença do parasita foi capaz de modular diferentes componentes da matriz extracelular, sendo que esta modulação está diretamente relacionada com as modificações nas interações heterotípicas entre TEC/timócitos. Por outro lado, destacamos que o aumento na produção de componentes da ECM na infecção de TEC poderia ser um mecanismo utilizado pelo *T. cruzi* para facilitar a infecção em células do microambiente tímico, tais como nas TEC. Essa hipótese é sustentada nos resultados obtidos em tratamentos das culturas de TEC por adição ou bloqueio de componentes da ECM, modulando a interação TEC/*T. cruzi*.

Um segundo aspecto estudado na presente tese, refere-se à morte de timócitos durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*. Estudos anteriores no modelo murino mostraram a participação direta de diferentes moléculas como *trans*-sialidase, TNF, glicocorticóides, galectina-3 e ATP extracelular (Leite de Moraes, 1991; Mantuano-Barradas, 2003; Mucci, 2006; Perez, 2007; Silva-Monteiro, 2007). Por outro lado, foi evidenciado que Fas e perforina não estariam envolvidos na

atrofia tímica de camundongos infectados pelo *T. cruzi* (Henriques-Pons, 2004). É interessante notar que nesses trabalhos os autores fazem referência apenas à depleção de células DP, não estando claro como outras subpopulações como DN, CD4⁺ e CD8⁺ são afetadas na infecção aguda. Nossos resultados demonstram que a atrofia do timo no curso da infecção aguda de camundongos infectados pela cepa Tulahuén (documento 4, figura 1a), está associada à perda da celularidade do órgão com comprometimento de todas as subpopulações de timócitos (DN, DP, CD4⁺ e CD8⁺) por apoptose, como demonstrado nos números absolutos e nas marcações por anexina-V (documento 4, figura 1c).

Como morte por apoptose está relacionada à intensa atividade de caspases (Taylor, 2008), investigamos as cascatas de ativação de caspases pela via extrínseca e intrínseca, analisando nas subpopulações de timócitos em camundongos normais e infectados. Vimos que a atrofia tímica que ocorre em camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, é em parte mediada por intensa atividade de caspases em timócitos, uma vez que os dados de anexina-V são similares aos de atividade de caspases (VAD-FITC). Além disso, verificamos que as células DP são o principal alvo da atividade de caspases, embora, também tenhamos observado apoptose e atividade de caspases em células DN, CD4⁺ e CD8⁺ (documento 4, figuras 1e 2).

De acordo com a literatura a atividade da caspase-8, é induzida por receptores como na interação Fas/FasL, TNFR/TNF e TRAIL. Por outro lado, a ativação pela via intrínseca, é iniciada pela caspase-9, e está relacionada com a privação de fatores de crescimento e liberação do citocromo *c* no citoplasma. Na investigação da morte celular por atividade de caspases, diversos autores demonstraram que, em seguida à ativação das caspases iniciadoras 8 ou 9, ocorre ativação de caspases efetoras, tais como 3 e 7 (Taylor, 2008; Tait e Green, 2010). Nossos resultados demonstraram em células DN, DP, CD4⁺ e CD8⁺ oriundas de animais infectados, que além da aumentada ativação de caspases 8 e 9, houve também importante participação da caspase-3 nas diferentes subpopulações de timócitos (documento 4, figura 2). Cabe salientar que analisando pontualmente essas subpopulações, vimos uma ativação preferencial da caspase-8 em células CD8⁺, sendo a caspase-9 mais evidente em células CD4⁺, apesar das duas caspases iniciadoras estarem aumentadas nessas células.

É importante ressaltar que caspases são abundantemente encontradas no processo de diferenciação intratímica de timócitos, e poderiam estar envolvidas na morte por apoptose (Zhang, 2005; Sohn, 2007). Por outro lado, foi demonstrado em camundongos deficientes para caspases-2, 3, 8 e 9 que a diferenciação de timócitos ocorria normalmente, apontando que a participação de caspases na geração de células apoptóticas durante a maturação de timócitos ainda precisa ser melhor esclarecida (Woo, 1998; Doerfler, 2000). Em nosso trabalho, demonstramos que a atividade das caspases 9, 8 e 3 em timócitos frescos, isolados de animais normais (não infectados) variava entre 2-10 por cento respectivamente (documento 4, figura 2).

Considerando o uso farmacológico de inibidores da morte por apoptose (Green e Kroemer, 2005), resolvemos investigar se o tratamento *in vitro* ou *in vivo* (por injeção intratímica) com zIETD-fmk e zLEHD-fmk (bloqueadores de ativação de caspase-8 e caspase-9 respectivamente) ou por zVAD-fmk (bloqueador geral da atividade de caspases), poderia inibir a atividade das caspases em timócitos de camundongos infectados. Verificamos inicialmente no tratamento *in vitro* inibição da morte de timócitos quando tratados por zVAD-fmk ou por zIETD-fmk, no entanto zLEHD-fmk teve efeito menor sobre essas células, comparando com o peptídeo controle zFA-fmk, indicando que as duas vias são ativadas na apoptose de timócitos. Esses resultados nos levaram a especular se o tratamento combinado das culturas com zIETD-fmk e zLEHD-fmk apresentaria resultados semelhantes àqueles observados em zVAD-fmk. Evidenciamos que após o tratamento combinado entre zIETD-fmk e zLEHD-fmk, houve significativa inibição de morte (documento 4, figura 3). Além disso, como vimos inibição de morte nos cultivos de timócitos oriundos dos camundongos infectados, era plausível pensar que semelhante tratamento *in vivo*, poderia reverter em parte a atrofia tímica observada no curso da infecção aguda pelo *T. cruzi*. Verificamos que quando os animais foram tratados por injeção intratímica com inibidores específicos, nenhum efeito significativo foi evidenciado nos números absolutos da celularidade total, assim como em cada subpopulação de timócitos. Por outro lado, tratamento com zVAD-fmk, foi capaz de inibir a atrofia tímica, protegendo particularmente as células imaturas DP e DN (documento 4, figura 4a, b e c).

Estes resultados evidenciam correlação direta entre a atrofia tímica e intensa atividade de caspases nas subpopulações DP, DN, CD4⁺ e CD8⁺ na infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, tais resultados não estabeleceram um papel funcional para o timo

na infecção experimental aguda pelo *T. cruzi*. Como revisado no documento 1, a infecção pelo *T. cruzi* gera importante ativação das respostas inata e adquirida, com expansão celular do baço e linfonodos subcutâneos, e persistente ativação policlonal de linfócitos T e B (Minoprio, 1986a; Minoprio, 1986b; de Meis, 2008; Chamond, 2009). Por outro lado, resulta em significativa atrofia do timo e dos linfonodos mesentéricos (Savino, 1989; de Meis, 2006; Savino, 2006). Para tentar esclarecer o papel do timo na dinâmica das populações linfocitárias em órgãos linfóides periféricos durante a infecção experimental aguda pelo *T. cruzi*, camundongos BALB/c timectomizados foram infectados por via intraperitoneal com 100 formas tripomastigotas da cepa Tulahuén do *T. cruzi*. Verificamos que a timectomia não alterou a celularidade dos linfonodos mesentéricos e subcutâneos. Porém, a ausência de células derivadas do timo durante o curso da infecção experimental aguda, aumentou significativamente o número de esplenócitos, indicando que células T derivadas do timo podem modular a celularidade do baço de camundongos infectados (documento 2, figura 3). É importante ressaltar que células T TCR $\gamma\delta^+$ isoladas do baço de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, exercem importante atividade supressora sobre linfócitos T (Cardillo, 1998). Adicionalmente, como demonstrado em animais timectomizados cronicamente infectados, a timectomia atuou inibindo os mecanismos imunoreguladores, gerando aumentada reação autoimune que culminou com a geração de danos ao miocárdio dos animais timectomizados (Bottasso, 1993).

Como mencionado anteriormente, *trans*-sialidase, TNF, hormônios glicocorticóides, galectina-3 e ATP extracelular, mas não Fas e perforina, promovem apoptose de timócitos na infecção pelo *T. cruzi* (Savino, 1989; Leite de Moraes, 1991; Leite-de-Moraes, 1992; Mantuano-Barradas, 2003; Henriques-Pons, 2004; Mucci, 2005; Mucci, 2006; Silva-Monteiro, 2007). Entretanto, a maioria desses estudos foram feitos *in vitro* em timócitos estimulados ou pela infecção de camundongos com disruptões gênicas para moléculas específicas. Nossos dados *in vivo*, claramente indicam que, a atrofia tímica e a apoptose de timócitos durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* envolve a ativação das caspases-8 e -9. Uma possível implicação no conhecimento dos mecanismos intracelulares da morte de timócitos é pontuar o principal indutor *in vivo* dessa morte. Entre as moléculas descritas envolvidas na depleção de timócitos no curso da infecção, nossos dados sugerem que glicocorticóides são fortes candidatos nesse fenômeno, uma vez que já foram descritos como relacionados a morte de timócitos e a ativação de caspases-8 e -9.

Além disso, o papel dos receptores de TNF na atrofia tímica durante a infecção pelo *T. cruzi* parece estar associado a uma resposta imunoneuroendócrina desregulada, estimulando o eixo HPA e levando a uma depleção induzida por glicocorticóides. Corroborando esta hipótese, verificamos que 90% dos timócitos foram marcados com anexina V depois de incubados com 100nM de hidrocortisona por 18 horas. Entretanto, tratamento com inibidores de caspases-8 (z-IETD) e -9 (zLEHD), bloqueou parcialmente a apoptose dessas células (50% de células anexina V⁺), sendo que o inibidor geral de caspases (z-VAD), bloqueou completamente os efeitos da hidrocortisona (30% das células anexina V⁺, similar ao controle) (dados não mostrados). Uma possível explicação para os efeitos negativos de Fas na apoptose de timócitos durante a infecção pelo *T. cruzi* é o fato de que Fas estimula a ativação da caspase-8 e nossos dados demonstram que o bloqueio dessa caspase *in vitro* e *in vivo* é suficiente para impedir a apoptose de timócitos. O mecanismo intracelular da apoptose de timócitos mediado por *trans*-sialidase, andrógenos, galectina-3 e ATP, precisam ser investigados mais profundamente.

8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O conjunto de resultados apresentados na presente tese nos leva a concluir que a infecção pelo *T. cruzi* gera distúrbios nos compartimentos epitelial e linfóide do timo, interferindo na capacidade das TEC em interagir com timócitos, promovendo ainda apoptose das subpopulações DP, DN, CD4⁺ e CD8⁺ pelas vias de caspase-8 e caspase-9. Além disso, concluímos que o timo exerce papel relevante na regulação da celularidade dinâmica linfocitária no baço de animais submetidos à infecção experimental aguda pelo *T. cruzi*. Neste contexto, acreditamos que será relevante continuar esses estudos conforme se segue:

1) Em camundongos submetidos à infecção aguda e tratados por injeção intratímica com zVAD-fmk .

- a) Investigar a frequência de células T reguladoras no timo, baço, linfonodo mesentérico, linfonodo subcutâneo e coração.
- b) Verificar a presença de recentes emigrantes tímicos em órgãos linfóides periféricos.
- c) Fazer análise comparativa da extensão da miocardite.

2) Em camundongos timectomizados e infectados.

- a) Investigar a frequência de células T reguladoras no baço, linfonodo mesentérico, linfonodo subcutâneo e coração.
- b) Fazer análise comparativa do grau de miocardite nestes animais.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfaro, D, Garcia-Ceca, J J, Cejalvo, T, Jimenez, E, Jenkinson, E J, Anderson, G, Munoz, J J e Zapata, A. EphrinB1-EphB signaling regulates thymocyte-epithelium interactions involved in functional T cell development. *Eur J Immunol.* 2007 Sep;37(9):2596-605.
- Aliberti, J C, Souto, J T, Marino, A P, Lannes-Vieira, J, Teixeira, M M, Farber, J, Gazzinelli, R T e Silva, J S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1433-40.
- Allende, M L, Dreier, J L, Mandala, S e Proia, R L. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem.* 2004 Apr 9;279(15):15396-401.
- Alves, L A, de Carvalho, A C e Savino, W. Gap junctions: a novel route for direct cell-cell communication in the immune system? *Immunol Today.* 1998 Jun;19(6):269-75.
- Anderson, G, Hare, K J, Platt, N e Jenkinson, E J. Discrimination between maintenance- and differentiation-inducing signals during initial and intermediate stages of positive selection. *Eur J Immunol.* 1997 Aug;27(8):1838-42.
- Anderson, G e Jenkinson, E J. Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):31-40.
- Anderson, G, Jenkinson, E J e Rodewald, H R. A roadmap for thymic epithelial cell development. *Eur J Immunol.* 2009 Jul;39(7):1694-9.
- Anderson, G, Moore, N C, Owen, J J e Jenkinson, E J. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:73-99.
- Anderson, M S, Venanzi, E S, Klein, L, Chen, Z, Berzins, S P, Turley, S J, von Boehmer, H, Bronson, R, Dierich, A, Benoist, C e Mathis, D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* 2002 Nov 15;298(5597):1395-401.

- Andrade, S G, Grimaud, J A e Stocker-Guerret, S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 1989 Mar;40(3):252-60.
- Anez, N, Carrasco, H, Parada, H, Crisante, G, Rojas, A, Fuenmayor, C, Gonzalez, N, Percoco, G, Borges, R, Guevara, P e Ramirez, J L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg. 1999 May;60(5):726-32.
- Annunziato, F, Romagnani, P, Cosmi, L, Lazzeri, E e Romagnani, S. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. Trends Immunol. 2001 May;22(5):277-81.
- Ardavin, C. Thymic dendritic cells. Immunol Today. 1997 Jul;18(7):350-61.
- Aumailley, M, Bruckner-Tuderman, L, Carter, W G, Deutzmann, R, Edgar, D, Ekblom, P, Engel, J, Engvall, E, Hohenester, E, Jones, J C, Kleinman, H K, Marinkovich, M P, Martin, G R, Mayer, U, Meneguzzi, G, Miner, J H, Miyazaki, K, Patarroyo, M, Paulsson, M, Quaranta, V, Sanes, J R, Sasaki, T, Sekiguchi, K, Sorokin, L M, Talts, J F, Tryggvason, K, Uitto, J, Virtanen, I, von der Mark, K, Wewer, U M, Yamada, Y e Yurchenco, P D. A simplified laminin nomenclature. Matrix Biol. 2005 Aug;24(5):326-32.
- Ayres-Martins, S, Lannes-Vieira, J, Farias-De-Oliveira, D A, Brito, J M, Villa-Verde, D M e Savino, W. Phagocytic cells of the thymic reticulum interact with thymocytes via extracellular matrix ligands and receptors. Cell Immunol. 2004 May;229(1):21-30.
- Badley, A D, Pilon, A A, Landay, A e Lynch, D H. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. Blood. 2000 Nov 1;96(9):2951-64.
- Bafica, A, Santiago, H C, Goldszmid, R, Ropert, C, Gazzinelli, R T e Sher, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. 2006 Sep 15;177(6):3515-9.

- Berrih, S, Savino, W e Cohen, S. Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 1985 Jul;33(7):655-64.
- Bilate, A M e Cunha-Neto, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008 Mar-Apr;50(2):67-74.
- Bilate, A M, Teixeira, P C, Ribeiro, S P, Brito, T, Silva, A M, Russo, M, Kalil, J e Cunha-Neto, E. Distinct outcomes of *Trypanosoma cruzi* infection in hamsters are related to myocardial parasitism, cytokine/chemokine gene expression, and protein expression profile. *J Infect Dis.* 2008 Aug 15;198(4):614-23.
- Bleesing, J J, Straus, S E e Fleisher, T A. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. A human disorder of abnormal lymphocyte survival. *Pediatr Clin North Am.* 2000 Dec;47(6):1291-310.
- Boatright, K M e Salvesen, G S. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Dec;15(6):725-31.
- Bodey, B, Siegel, S E e Kaiser, H E. Antigen presentation by dendritic cells and their significance in antineoplastic immunotherapy. *In Vivo.* 2004 Jan-Feb;18(1):81-100.
- Boehm, T, Scheu, S, Pfeffer, K e Bleul, C C. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):757-69.
- Boscardin, S B, Torrecilhas, A C, Manarin, R, Revelli, S, Rey, E G, Tonelli, R R e Silber, A M. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med.* 2010 Jun;14(6B):1373-84.
- Bossy-Wetzel, E e Green, D R. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res.* 1999 Jul 30;434(3):243-51.
- Bottasso, O A, Revelli, S S, Davila, H, Valenti, J L, Musso, O C, Ferro, M E, Romero-Piffiguer, M e Morini, J C. Enhanced myocardial lesions in chronically *Trypanosoma cruzi*-infected rats subjected to adult thymectomy. *Immunol Lett.* 1993 Aug;37(2-3):175-80.

- Boyd, R L, Tucek, C L, Godfrey, D I, Izon, D J, Wilson, T J, Davidson, N J, Bean, A G, Ladyman, H M, Ritter, M A e Hugo, P. The thymic microenvironment. *Immunol Today*. 1993 Sep;14(9):445-59.
- Brabb, T, Huseby, E S, Morgan, T M, Sant'Angelo, D B, Kirchner, J, Farr, A G e Goverman, J. Thymic stromal organization is regulated by the specificity of T cell receptor/major histocompatibility complex interactions. *Eur J Immunol*. 1997 Jan;27(1):136-46.
- Brener, Z e Gazzinelli, R T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 Oct;114(2):103-10.
- Brown, W C e Corral, R S. Stimulation of B lymphocytes, macrophages, and dendritic cells by protozoan DNA. *Microbes Infect*. 2002 Jul;4(9):969-74.
- Brugnera, E, Bhandoola, A, Cibotti, R, Yu, Q, Guinter, T I, Yamashita, Y, Sharrow, S O e Singer, A. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity*. 2000 Jul;13(1):59-71.
- Bruijntjes, J P, Kuper, C F, Robinson, J E e Schuurman, H J. Epithelium-free area in the thymic cortex of rats. *Dev Immunol*. 1993;3(2):113-22.
- Budihardjo, I, Oliver, H, Lutter, M, Luo, X e Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:269-90.
- Caldas, I S, Talvani, A, Caldas, S, Carneiro, C M, de Lana, M, da Matta Guedes, P M e Bahia, M T. Benzimidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol Res*. 2008 Jul;103(2):413-21.
- Camargo, M M, Almeida, I C, Pereira, M E, Ferguson, M A, Travassos, L R e Gazzinelli, R T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*. 1997 Jun 15;158(12):5890-901.

- Campbell, D A, Westenberger, S J e Sturm, N R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med*. 2004 Sep;4(6):549-62.
- Campos, M A, Almeida, I C, Takeuchi, O, Akira, S, Valente, E P, Procopio, D O, Travassos, L R, Smith, J A, Golenbock, D T e Gazzinelli, R T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*. 2001 Jul 1;167(1):416-23.
- Campos, M A, Closel, M, Valente, E P, Cardoso, J E, Akira, S, Alvarez-Leite, J I, Ropert, C e Gazzinelli, R T. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1711-8.
- Campos, M A e Gazzinelli, R T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm*. 2004 Jun;13(3):139-43.
- Capone, M, Hockett, R D, Jr. e Zlotnik, A. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 13;95(21):12522-7.
- Cardenas, T C, Johnson, C A, Pratap, S, Nde, P N, Furtak, V, Kleshchenko, Y Y, Lima, M F e Villalta, F. REGULATION of the EXTRACELLULAR MATRIX INTERACTOME by *Trypanosoma cruzi*. *Open Parasitol J*. 2010;4:72-6.
- Cardillo, F, Nomizo, A e Mengel, J. The role of the thymus in modulating gammadelta T cell suppressor activity during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol*. 1998 Feb;10(2):107-16.
- Castro, C, Prata, A e Macedo, V. [The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas' disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Jan-Feb;38(1):1-6.
- Chai, J, Du, C, Wu, J W, Kyin, S, Wang, X e Shi, Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*. 2000 Aug 24;406(6798):855-62.

- Chammas, R, Veiga, S S, Line, S, Potocnjak, P e Brentani, R R. Asn-linked oligosaccharide-dependent interaction between laminin and gp120/140. An alpha 6/beta 1 integrin. *J Biol Chem*. 1991 Feb 15;266(5):3349-55.
- Chamond, N, Cosson, A, Coatnoan, N e Minoprio, P. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a *Trypanosoma vivax* proline racemase. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Jun;165(2):170-9.
- Chandrasekar, B, Melby, P C, Troyer, D A, Colston, J T e Freeman, G L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol*. 1998 Apr;152(4):925-34.
- Chandrasekaran, S, Dean, J W, 3rd, Giniger, M S e Tanzer, M L. Laminin carbohydrates are implicated in cell signaling. *J Cell Biochem*. 1991 Jun;46(2):115-24.
- Chiba, K, Matsuyuki, H, Maeda, Y e Sugahara, K. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol*. 2006 Feb;3(1):11-9.
- Ciofani, M e Zuniga-Pflucker, J C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:463-93.
- Cole, T J, Liddicoat, D R e Godfrey, D I. Intrathymic glucocorticoid production and thymocyte survival: another piece in the puzzle. *Endocrinology*. 2005 Jun;146(6):2499-500.
- Correa-de-Santana, E, Paez-Pereda, M, Theodoropoulou, M, Kenji Nihei, O, Gruebler, Y, Bozza, M, Arzt, E, Villa-Verde, D M, Renner, U, Stalla, J, Stalla, G K e Savino, W. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J Neuroimmunol*. 2006a Apr;173(1-2):12-22.
- Correa-de-Santana, E, Pinto-Mariz, F e Savino, W. Immunoneuroendocrine interactions in Chagas disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006b Nov;1088:274-83.
- Costa, R P, Gollob, K J, Fonseca, L L, Rocha, M O, Chaves, A C, Medrano-Mercado, N, Araujo-Jorge, T C, Antas, P R, Colley, D G, Correa-Oliveira, R, Gazzinelli, G, Carvalho-Parra, J e Dutra, W O. T-cell repertoire analysis in acute and chronic

- human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. *Scand J Immunol.* 2000 May;51(5):511-9.
- Cotta-de-Almeida, V, Bertho, A L, Villa-Verde, D M e Savino, W. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Feb;82(2):125-32.
- Cotta-de-Almeida, V, Bonomo, A, Mendes-da-Cruz, D A, Riederer, I, De Meis, J, Lima-Quaresma, K R, Vieira-de-Abreu, A, Villa-Verde, D M e Savino, W. *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol.* 2003 Sep;33(9):2439-48.
- Coura, J R e Borges-Pereira, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug;115(1-2):5-13.
- Coura, J R e Dias, J C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.
- Crivellato, E, Vacca, A e Ribatti, D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol.* 2004 Apr;25(4):210-7.
- Cunha-Neto, E, Duranti, M, Gruber, A, Zingales, B, De Messias, I, Stolf, N, Bellotti, G, Patarroyo, M E, Pilleggi, F e Kalil, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 11;92(8):3541-5.
- d'Imperio Lima, M R, Eisen, H, Minoprio, P, Joskowicz, M e Coutinho, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 1986 Jul 1;137(1):353-6.
- D'Souza, S E, Ginsberg, M H e Plow, E F. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci.* 1991 Jul;16(7):246-50.
- Da Costa, S C, Calabrese, K S, Bauer, P G, Savino, W e Lagrange, P H. Studies of the thymus in Chagas' disease: III. Colonization of the thymus and other lymphoid

- organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathol Biol (Paris)*. 1991 Feb;39(2):91-7.
- Dardenne, M e Savino, W. Control of thymus physiology by peptidic hormones and neuropeptides. *Immunol Today*. 1994 Nov;15(11):518-23.
- Dardenne, M, Savino, W, Gagnerault, M C, Itoh, T e Bach, J F. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. *Endocrinology*. 1989 Jul;125(1):3-12.
- Dardenne, M, Smaniotto, S, de Mello-Coelho, V, Villa-Verde, D M e Savino, W. Growth hormone modulates migration of developing T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Feb;1153:1-5.
- de Freitas, J M, Augusto-Pinto, L, Pimenta, J R, Bastos-Rodrigues, L, Goncalves, V F, Teixeira, S M, Chiari, E, Junqueira, A C, Fernandes, O, Macedo, A M, Machado, C R e Pena, S D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006 Mar;2(3):e24.
- de Meis, J, Ferreira, L M, Guillermo, L V, Silva, E M, Dosreis, G A e Lopes, M F. Apoptosis differentially regulates mesenteric and subcutaneous lymph node immune responses to *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol*. 2008 Jan;38(1):139-46.
- de Meis, J, Mendes-da-Cruz, D A, Farias-de-Oliveira, D A, Correa-de-Santana, E, Pinto-Mariz, F, Cotta-de-Almeida, V, Bonomo, A e Savino, W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFR1/TNF pathways. *Microbes Infect*. 2006 Jan;8(1):221-31.
- de Sousa, M, Tilney, N L e Kupiec-Weglinski, J W. Recognition of self within self: specific lymphocyte positioning and the extracellular matrix. *Immunol Today*. 1991 Aug;12(8):262-6.
- De Souza, L R e Savino, W. Modulation of cytokeratin expression in the hamster thymus: evidence for a plasticity of the thymic epithelium. *Dev Immunol*. 1993;3(2):137-46.
- De Souza, L R, Trajano, V e Savino, W. Is there an interspecific diversity of the thymic microenvironment? *Dev Immunol*. 1993;3(2):123-35.

- Derbinski, J, Gabler, J, Brors, B, Tierling, S, Jonnakuty, S, Hergenahn, M, Peltonen, L, Walter, J e Kyewski, B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med.* 2005 Jul 4;202(1):33-45.
- Derbinski, J, Schulte, A, Kyewski, B e Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* 2001 Nov;2(11):1032-9.
- Desagher, S e Martinou, J C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000 Sep;10(9):369-77.
- Deveraux, Q L e Reed, J C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999 Feb 1;13(3):239-52.
- Doerfler, P, Forbush, K A e Perlmutter, R M. Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development. *J Immunol.* 2000 Apr 15;164(8):4071-9.
- dos Santos, P V, Roffe, E, Santiago, H C, Torres, R A, Marino, A P, Paiva, C N, Silva, A A, Gazzinelli, R T e Lannes-Vieira, J. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* 2001 Oct;3(12):971-84.
- Du, C, Fang, M, Li, Y, Li, L e Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):33-42.
- Duijvestijn, A M, Sminia, T, Kohler, Y G, Janse, E M e Hoefsmit, E C. Rat thymus micro-environment: an ultrastructural and functional characterization. *Adv Exp Med Biol.* 1982;149:441-6.
- Dunkle, A, Dzhagalov, I e He, Y W. Mcl-1 promotes survival of thymocytes by inhibition of Bak in a pathway separate from Bcl-2. *Cell Death Differ.* 2010 Jun;17(6):994-1002.
- Engvall, E e Wewer, U M. Domains of laminin. *J Cell Biochem.* 1996 Jun 15;61(4):493-501.

- Fae, K C, Diefenbach da Silva, D, Bilate, A M, Tanaka, A C, Pomerantzeff, P M, Kiss, M H, Silva, C A, Cunha-Neto, E, Kalil, J e Guilherme, L. PDIA3, HSPA5 and vimentin, proteins identified by 2-DE in the valvular tissue, are the target antigens of peripheral and heart infiltrating T cells from chronic rheumatic heart disease patients. *J Autoimmun.* 2008 Sep;31(2):136-41.
- Ferreira, C G, Epping, M, Kruyt, F A e Giaccone, G. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2002 Jul;8(7):2024-34.
- Ferri, K F, Jacotot, E, Blanco, J, Este, J A e Kroemer, G. Mitochondrial control of cell death induced by HIV-1-encoded proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:149-64.
- Fichera, L E, Albareda, M C, Laucella, S A e Postan, M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun.* 2004 Jan;72(1):359-63.
- Fonseca, E C, Lannes-Vieira, J, Villa-Verde, D M e Savino, W. Thymic extracellular matrix in Down's syndrome. *Braz J Med Biol Res.* 1989;22(8):971-4.
- Fontecha, A M, Alvarez, A, Navarro, R, Zapata, A e Ardavin, C. Rat thymic cultures: morphological and phenotypical characterization. *Immunology.* 1991 Jun;73(2):165-72.
- Ford, C E e Micklem, H S. The thymus and lymph-nodes in radiation chimaeras. *Lancet.* 1963 Feb 16;1(7277):359-62.
- Freire-de-Lima, C G, Nascimento, D O, Soares, M B, Bozza, P T, Castro-Faria-Neto, H C, de Mello, F G, DosReis, G A e Lopes, M F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000 Jan 13;403(6766):199-203.
- Fuenmayor, C, Higuchi, M L, Carrasco, H, Parada, H, Gutierrez, P, Aiello, V e Palomino, S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol.* 2005 Feb;60(1):33-7.
- Fulda, S e Debatin, K M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006 Aug 7;25(34):4798-811.

- Gabor, M J, Godfrey, D I e Scollay, R. Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes. *Eur J Immunol.* 1997 Aug;27(8):2010-5.
- Galluzzi, L, Joza, N, Tasdemir, E, Maiuri, M C, Hengartner, M, Abrams, J M, Tavernarakis, N, Penninger, J, Madeo, F e Kroemer, G. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ.* 2008 Jul;15(7):1113-23.
- Gameiro, J, Nagib, P R, Andrade, C F, Villa-Verde, D M, Silva-Barbosa, S D, Savino, W, Costa, F T e Verinaud, L. Changes in cell migration-related molecules expressed by thymic microenvironment during experimental *Plasmodium berghei* infection: consequences on thymocyte development. *Immunology.* 2010 Feb;129(2):248-56.
- Ge, Q e Chen, W F. Phenotypic identification of the subgroups of murine T-cell receptor alphabeta+ CD4+ CD8- thymocytes and its implication in the late stage of thymocyte development. *Immunology.* 1999 Aug;97(4):665-71.
- Geenen, V, Robert, F, Defresne, M P, Boniver, J, Legros, J J e Franchimont, P. Neuroendocrinology of the thymus. *Horm Res.* 1989;31(1-2):81-4.
- Geiger, B, Bershadsky, A, Pankov, R e Yamada, K M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):793-805.
- Geiger, B e Yamada, K M. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(5).
- George, A J e Ritter, M A. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today.* 1996 Jun;17(6):267-72.
- Ghobrial, I M, Witzig, T E e Adjei, A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005 May-Jun;55(3):178-94.
- Giordano, R, Chammas, R, Veiga, S S, Colli, W e Alves, M J. *Trypanosoma cruzi* binds to laminin in a carbohydrate-independent way. *Braz J Med Biol Res.* 1994 Sep;27(9):2315-8.

- Giunta, M, Favre, A, Ramarli, D, Grossi, C E e Corte, G. A novel integrin involved in thymocyte-thymic epithelial cell interactions. *J Exp Med*. 1991 Jun 1;173(6):1537-48.
- Godfrey, D I, Izon, D J, Tucek, C L, Wilson, T J e Boyd, R L. The phenotypic heterogeneity of mouse thymic stromal cells. *Immunology*. 1990 May;70(1):66-74.
- Godfrey, D I e Zlotnik, A. Control points in early T-cell development. *Immunol Today*. 1993 Nov;14(11):547-53.
- Golgher, D e Gazzinelli, R T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*. 2004 Aug;37(5):399-409.
- Gordon, J, Wilson, V A, Blair, N F, Sheridan, J, Farley, A, Wilson, L, Manley, N R e Blackburn, C C. Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat Immunol*. 2004 May;5(5):546-53.
- Gottlieb, E, Vander Heiden, M G e Thompson, C B. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2000 Aug;20(15):5680-9.
- Gottlieb, R A. Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept*. 2001 May-Aug;10(3-4):147-61.
- Gray, D H, Tull, D, Ueno, T, Seach, N, Classon, B J, Chidgey, A, McConville, M J e Boyd, R L. A unique thymic fibroblast population revealed by the monoclonal antibody MTS-15. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4956-65.
- Green, D R e Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004 Jul 30;305(5684):626-9.
- Green, D R e Kroemer, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2610-7.
- Gupta, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol*. 2003 Jan;22(1):15-20.

- Gutierrez, F R, Guedes, P M, Gazzinelli, R T e Silva, J S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 2009 Nov;31(11):673-85.
- Guyden, J C e Pezzano, M. Thymic nurse cells: a microenvironment for thymocyte development and selection. *Int Rev Cytol.* 2003;223:1-37.
- Haks, M C, Oosterwegel, M A, Blom, B, Spits, H M e Kruisbeek, A M. Cell-fate decisions in early T cell development: regulation by cytokine receptors and the pre-TCR. *Semin Immunol.* 1999 Feb;11(1):23-37.
- Hall, B S, Tam, W, Sen, R e Pereira, M E. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Mol Biol Cell.* 2000 Jan;11(1):153-60.
- Hare, K J, Jenkinson, E J e Anderson, G. In vitro models of T cell development. *Semin Immunol.* 1999 Feb;11(1):3-12.
- Hatcher, F M, Kuhn, R E, Cerrone, M C e Burton, R C. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. *J Immunol.* 1981 Sep;127(3):1126-30.
- Heath, W R, Belz, G T, Behrens, G M, Smith, C M, Forehan, S P, Parish, I A, Davey, G M, Wilson, N S, Carbone, F R e Villadangos, J A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004 Jun;199:9-26.
- Hengartner, M O. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
- Henriques-Pons, A, DeMeis, J, Cotta-De-Almeida, V, Savino, W e Araujo-Jorge, T C. Fas and perforin are not required for thymus atrophy induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* 2004 May-Jun;107(1-2):1-4.
- Henry, L. Involution of the human thymus. *J Pathol Bacteriol.* 1967 Apr;93(2):661-71.
- Higuchi Mde, L, Gutierrez, P S, Aiello, V D, Palomino, S, Bocchi, E, Kalil, J, Bellotti, G e Pileggi, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human

- chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(3):157-60.
- Higuchi, M L, De Moraes, C F, Pereira Barreto, A C, Lopes, E A, Stolf, N, Bellotti, G e Pileggi, F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 1987 Nov;10(11):665-70.
- Holscher, C, Mohrs, M, Dai, W J, Kohler, G, Ryffel, B, Schaub, G A, Mossmann, H e Brombacher, F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):4075-83.
- Hunter, C A, Ellis-Neyes, L A, Slifer, T, Kanaly, S, Grunig, G, Fort, M, Rennick, D e Araujo, F G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1997 Apr 1;158(7):3311-6.
- Hynes, R O e Naba, A. Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Sep 21.
- Hynes, R O e Yamada, K M. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol.* 1982 Nov;95(2 Pt 1):369-77.
- Jenkinson, W E, Jenkinson, E J e Anderson, G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J Exp Med.* 2003 Jul 21;198(2):325-32.
- Jondal, M, Pazirandeh, A e Okret, S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol.* 2004 Nov;25(11):595-600.
- Jones, E M, Colley, D G, Tostes, S, Lopes, E R, Vnencak-Jones, C L e McCurley, T L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Mar;48(3):348-57.
- Junqueira, C, Caetano, B, Bartholomeu, D C, Melo, M B, Ropert, C, Rodrigues, M M e Gazzinelli, R T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 2010;12:e29.

- Juntilla, M M, Wofford, J A, Birnbaum, M J, Rathmell, J C e Koretzky, G A. Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 17;104(29):12105-10.
- Kampinga, J, Berges, S, Boyd, R L, Brekelmans, P, Colic, M, van Ewijk, W, Kendall, M D, Ladyman, H, Nieuwenhuis, P, Ritter, M A e et al. Thymic epithelial antibodies: immunohistological analysis and introduction of nomenclature. Thymus. 1989;13(3-4):165-73.
- Kendall, M D, van de Wijngaert, F P, Schuurman, H J, Rademakers, L H e Kater, L. Heterogeneity of the human thymus epithelial microenvironment at the ultrastructural level. Adv Exp Med Biol. 1985;186:289-97.
- Khaled, A R, Kim, K, Hofmeister, R, Muegge, K e Durum, S K. Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7;96(25):14476-81.
- Kierszenbaum, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbiol Rev. 1999 Apr;12(2):210-23.
- Kim, C H e Broxmeyer, H E. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. J Leukoc Biol. 1999 Jan;65(1):6-15.
- Kleshchenko, Y Y, Moody, T N, Furtak, V A, Ochieng, J, Lima, M F e Villalta, F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. Infect Immun. 2004 Nov;72(11):6717-21.
- Kondo, M, Akashi, K, Domen, J, Sugamura, K e Weissman, I L. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis, but not B or NK cell development, in common gamma chain-deficient mice. Immunity. 1997 Jul;7(1):155-62.
- Krammer, P H. CD95's deadly mission in the immune system. Nature. 2000 Oct 12;407(6805):789-95.
- Krettli, A U e Brener, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. J Immunol. 1976 Mar;116(3):755-60.
- Krueger, A. A missing link in thymic dendritic cell development. Eur J Immunol. 2011 Aug;41(8):2145-7.

- Kumar, S e Tarleton, R L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 1998 May;20(5):207-16.
- Kyewski, B e Derbinski, J. Self-representation in the thymus: an extended view. Nat Rev Immunol. 2004 Sep;4(9):688-98.
- Laiosa, C V, Stadtfeld, M e Graf, T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. Annu Rev Immunol. 2006;24:705-38.
- Lannes-Vieira, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Apr;98(3):299-304.
- Lannes-Vieira, J, Chammas, R, Villa-Verde, D M, Vannier-dos-Santos, M A, Mello-Coelho, V, de Souza, S J, Brentani, R R e Savino, W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. Int Immunol. 1993 Nov;5(11):1421-30.
- Lannes-Vieira, J, Cirne-Lima, E O e Savino, W. Hydrocortisone modulates cytokeratin and extracellular matrix expression by the thymic microenvironment. Ann N Y Acad Sci. 1992 Apr 15;650:81-4.
- Lannes-Vieira, J, Dardenne, M e Savino, W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. J Histochem Cytochem. 1991 Nov;39(11):1539-46.
- Laucella, S, Salcedo, R, Castanos-Velez, E, Riarte, A, De Titto, E H, Patarroyo, M, Orn, A e Rottenberg, M E. Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 1996 May;18(5):227-39.
- Le Lievre, C S e Le Douarin, N M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. J Embryol Exp Morphol. 1975 Aug;34(1):125-54.

- Leite-de-Moraes, M C, Coutinho, A, Hontebeyrie-Joskowicz, M, Minoprio, P, Eisen, H e Bandeira, A. Skewed V beta TCR repertoire of CD8+ T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol*. 1994 Mar;6(3):387-92.
- Leite-de-Moraes, M C, Hontebeyrie-Joskowicz, M, Dardenne, M e Savino, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*. 1992 Sep;77(1):95-8.
- Leite de Moraes, M C, Hontebeyrie-Joskowicz, M, Leboulenger, F, Savino, W, Dardenne, M e Lepault, F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. *Scand J Immunol*. 1991 Mar;33(3):267-75.
- Leon, J S, Godsel, L M, Wang, K e Engman, D M. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infect Immun*. 2001 Sep;69(9):5643-9.
- Lepelletier, Y, Smaniotto, S, Hadj-Slimane, R, Villa-Verde, D M, Nogueira, A C, Dardenne, M, Hermine, O e Savino, W. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5545-50.
- Li, F e Ling, X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? *J Cell Physiol*. 2006 Sep;208(3):476-86.
- Li, W Q, Jiang, Q, Khaled, A R, Keller, J R e Durum, S K. Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J Biol Chem*. 2004 Jul 9;279(28):29160-6.
- Lind, E F, Prockop, S E, Porritt, H E e Petrie, H T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*. 2001 Jul 16;194(2):127-34.
- Linhares-Lacerda, L, Ribeiro-Alves, M, Nogueira, A C, Mendes-da-Cruz, D A, Magalhaes, D A, Dardenne, M, Passos, G A e Savino, W. RNA interference-mediated knockdown of CD49e (alpha5 integrin chain) in human thymic epithelial cells modulates the expression of multiple genes and decreases thymocyte adhesion. *BMC Genomics*. 2010;11 Suppl 5:S2.

- Liu, Q A e Hengartner, M O. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:92-104.
- Livak, F, Tourigny, M, Schatz, D G e Petrie, H T. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2575-80.
- Lobach, D F e Haynes, B F. Ontogeny of the human thymus during fetal development. *J Clin Immunol*. 1987 Mar;7(2):81-97.
- Loeffler, M e Kroemer, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):19-26.
- Lopes, M F, da Veiga, V F, Santos, A R, Fonseca, M E e DosReis, G A. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol*. 1995 Jan 15;154(2):744-52.
- Lopes, M F, Nunes, M P, Henriques-Pons, A, Giese, N, Morse, H C, 3rd, Davidson, W F, Araujo-Jorge, T C e DosReis, G A. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient *gld* mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur J Immunol*. 1999 Jan;29(1):81-9.
- Lu, P, Takai, K, Weaver, V M e Werb, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Sep 14.
- Lyra, J S, Madi, K, Maeda, C T e Savino, W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J Pathol*. 1993 Nov;171(3):231-6.
- Macdonald, P R, Lustig, A, Steinmetz, M O e Kammerer, R A. Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *J Struct Biol*. 2010 May;170(2):398-405.
- Macedo, A M, Oliveira, R P e Pena, S D. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2002 Mar;4(5):1-16.
- Machado, F S, Martins, G A, Aliberti, J C, Mestriner, F L, Cunha, F Q e Silva, J S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines

- that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000 Dec 12;102(24):3003-8.
- Mandal, M, Borowski, C, Palomero, T, Ferrando, A A, Oberdoerffer, P, Meng, F, Ruiz-Vela, A, Ciofani, M, Zuniga-Pflucker, J C, Screpanti, I, Look, A T, Korsmeyer, S J, Rajewsky, K, von Boehmer, H e Aifantis, I. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med*. 2005 Feb 21;201(4):603-14.
- Mantuano-Barradas, M, Henriques-Pons, A, Araujo-Jorge, T C, Di Virgilio, F, Coutinho-Silva, R e Persechini, P M. Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8+ double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 2003 Dec;5(15):1363-71.
- Martin, D L, Weatherly, D B, Laucella, S A, Cabinian, M A, Crim, M T, Sullivan, S, Heiges, M, Craven, S H, Rosenberg, C S, Collins, M H, Sette, A, Postan, M e Tarleton, R L. CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog*. 2006 Aug;2(8):e77.
- Martins, G A, Petkova, S B, Machado, F S, Kitsis, R N, Weiss, L M, Wittner, M, Tanowitz, H B e Silva, J S. Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Immunology*. 2001 May;103(1):122-9.
- Martins, G A, Vieira, L Q, Cunha, F Q e Silva, J S. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun*. 1999 Aug;67(8):3864-71.
- Mathis, D e Benoist, C. A decade of AIRE. *Nat Rev Immunol*. 2007 Aug;7(8):645-50.
- Matloubian, M, Lo, C G, Cinamon, G, Lesneski, M J, Xu, Y, Brinkmann, V, Allende, M L, Proia, R L e Cyster, J G. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004 Jan 22;427(6972):355-60.
- Mendes-da-Cruz, D A, de Meis, J, Cotta-de-Almeida, V e Savino, W. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect*. 2003 Aug;5(10):825-32.

- Mendes-da-Cruz, D A, Silva, J S, Cotta-de-Almeida, V e Savino, W. Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. Eur J Immunol. 2006 Jun;36(6):1486-93.
- Michailowsky, V, Silva, N M, Rocha, C D, Vieira, L Q, Lannes-Vieira, J e Gazzinelli, R T. 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 Nov;159(5):1723-33.
- Milicevic, N M e Milicevic, Z. Thymus cell-cell interactions. Int Rev Cytol. 2004;235:1-52.
- Miner, J H. Laminins and their roles in mammals. Microsc Res Tech. 2008 May;71(5):349-56.
- Minoprio, P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? Int J Parasitol. 2001 May 1;31(5-6):588-91.
- Minoprio, P, Eisen, H, Joskowicz, M, Pereira, P e Coutinho, A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. J Immunol. 1987 Jul 15;139(2):545-50.
- Minoprio, P M, Coutinho, A, Joskowicz, M, D'Imperio Lima, M R e Eisen, H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. Scand J Immunol. 1986a Dec;24(6):669-79.
- Minoprio, P M, Eisen, H, Forni, L, D'Imperio Lima, M R, Joskowicz, M e Coutinho, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. Scand J Immunol. 1986b Dec;24(6):661-8.
- Miyamoto, S, Katz, B Z, Lafrenie, R M e Yamada, K M. Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. Ann N Y Acad Sci. 1998 Oct 23;857:119-29.
- Moncayo, A e Silveira, A C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:17-30.

- Moody, T N, Ochieng, J e Villalta, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. FEBS Lett. 2000 Mar 31;470(3):305-8.
- Mori, K, Itoi, M, Tsukamoto, N, Kubo, H e Amagai, T. The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma. Int Immunol. 2007 Jun;19(6):745-53.
- Morrot, A, Terra-Granado, E, Perez, A R, Silva-Barbosa, S D, Milicevic, N M, Farias-de-Oliveira, D A, Berbert, L R, De Meis, J, Takiya, C M, Beloscar, J, Wang, X, Kont, V, Peterson, P, Bottasso, O e Savino, W. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Aug;5(8):e1268.
- Mountz, J D, Bluethmann, H, Zhou, T e Wu, J. Defective clonal deletion and anergy induction in TCR transgenic lpr/lpr mice. Semin Immunol. 1994 Feb;6(1):27-37.
- Mucci, J, Hidalgo, A, Mocetti, E, Argibay, P F, Leguizamon, M S e Campetella, O. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Mar 19;99(6):3896-901.
- Mucci, J, Mocetti, E, Leguizamon, M S e Campetella, O. A sexual dimorphism in intrathymic sialylation survey is revealed by the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 2005 Apr 15;174(8):4545-50.
- Mucci, J, Risso, M G, Leguizamon, M S, Frasch, A C e Campetella, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. Cell Microbiol. 2006 Jul;8(7):1086-95.
- Muller, U, Sobek, V, Balkow, S, Holscher, C, Mullbacher, A, Museteanu, C, Mossmann, H e Simon, M M. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. Eur J Immunol. 2003 Jan;33(1):70-8.
- Nagata, S e Suda, T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol Today. 1995 Jan;16(1):39-43.

- Naismith, J H e Sprang, S R. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998 Feb;23(2):74-9.
- Naquet, P, Naspetti, M e Boyd, R. Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice. *Semin Immunol.* 1999 Feb;11(1):47-55.
- Nde, P N, Simmons, K J, Kleshchenko, Y Y, Pratap, S, Lima, M F e Villalta, F. Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 2006 Mar;74(3):1643-8.
- Newton, K, Harris, A W e Strasser, A. FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *EMBO J.* 2000 Mar 1;19(5):931-41.
- Nicholson, D W e Thornberry, N A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997 Aug;22(8):299-306.
- Nihei, O K, Fonseca, P C, Rubim, N M, Bonavita, A G, Lyra, J S, Neves-dos-Santos, S, de Carvalho, A C, Spray, D C, Savino, W e Alves, L A. Modulatory effects of cAMP and PKC activation on gap junctional intercellular communication among thymic epithelial cells. *BMC Cell Biol.* 2010;11:3.
- Nitta, T, Murata, S, Ueno, T, Tanaka, K e Takahama, Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol.* 2008;99:59-94.
- Norment, A M e Bevan, M J. Role of chemokines in thymocyte development. *Semin Immunol.* 2000 Oct;12(5):445-55.
- Ocampo, J S, de Brito, J M, Correa-de-Santana, E, Borojevic, R, Villa-Verde, D M e Savino, W. Laminin-211 controls thymocyte--thymic epithelial cell interactions. *Cell Immunol.* 2008;254(1):1-9.
- Oliveira-dos-Santos, A J, Rieker-Geley, T, Recheis, H e Wick, G. Murine thymic nurse cells and rosettes: analysis of adhesion molecule expression using confocal microscopy and a simplified enrichment method. *J Histochem Cytochem.* 1997 Sep;45(9):1293-7.

- Olivieri, B P, Farias-De-Oliveira, D A, Araujo-Jorge, T C e Cotta-de-Almeida, V. Benzimidazole therapy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice blocks thymic involution and apoptosis of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 May;49(5):1981-7.
- Ortiz-Ortiz, L, Ortega, T, Capin, R e Martinez, T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1976;50(2):232-42.
- Ouaissi, M A, Cornette, J e Capron, A. *Trypanosoma cruzi*: modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. *Eur J Immunol.* 1985 Nov;15(11):1096-101.
- Ozbek, S, Balasubramanian, P G, Chiquet-Ehrismann, R, Tucker, R P e Adams, J C. The evolution of extracellular matrix. *Mol Biol Cell.* 2010 Dec;21(24):4300-5.
- Palmer, D B, Hayday, A e Owen, M J. Is TCR beta expression an essential event in early thymocyte development? *Immunol Today.* 1993 Sep;14(9):460-2.
- Papiernik, M e Homo-Delarche, F. Thymic reticulum in mice. III. Phagocytic cells of the thymic reticulum in culture secrete both prostaglandin E2 and interleukin 1 which regulate thymocyte proliferation. *Eur J Immunol.* 1983 Aug;13(8):689-92.
- Papiernik, M, Nabarra, B, Savino, W, Pontoux, C e Barbey, S. Thymic reticulum in mice. II. Culture and characterization of nonepithelial phagocytic cells of the thymic reticulum: their role in the syngeneic stimulation of thymic medullary lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1983 Feb;13(2):147-55.
- Papiernik, M, Penit, C e el Rouby, S. Control of prothymocyte proliferation by thymic accessory cells. *Eur J Immunol.* 1987 Sep;17(9):1303-10.
- Patel, D D e Haynes, B F. Cell adhesion molecules involved in intrathymic T cell development. *Semin Immunol.* 1993 Aug;5(4):282-92.
- Pellegrini, M, Bouillet, P, Robati, M, Belz, G T, Davey, G M e Strasser, A. Loss of Bim increases T cell production and function in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med.* 2004 Nov 1;200(9):1189-95.
- Pelletier, A J, van der Laan, L J, Hildbrand, P, Siani, M A, Thompson, D A, Dawson, P E, Torbett, B E e Salomon, D R. Presentation of chemokine SDF-1 alpha by

- fibronectin mediates directed migration of T cells. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2682-90.
- Penit, C, Lucas, B e Vasseur, F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5103-13.
- Penit, C e Papiernik, M. Regulation of thymocyte proliferation and survival by deoxynucleosides. Deoxycytidine produced by thymic accessory cells protects thymocytes from deoxyguanosine toxicity and stimulates their spontaneous proliferation. *Eur J Immunol*. 1986 Mar;16(3):257-63.
- Pereira, K S, Schmidt, F L, Guaraldo, A M, Franco, R M, Dias, V L e Passos, L A. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot*. 2009 Feb;72(2):441-6.
- Perez, A R, Roggero, E, Nicora, A, Palazzi, J, Besedovsky, H O, Del Rey, A e Bottasso, O A. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain Behav Immun*. 2007 Oct;21(7):890-900.
- Petray, P, Corral, R, Meckert, P e Laguens, R. Role of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2002 Sep;83(3):205-11.
- Petrie, H T. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2003 Nov;3(11):859-66.
- Petrie, H T, Livak, F, Burtrum, D e Mazel, S. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J Exp Med*. 1995 Jul 1;182(1):121-7.
- Petrie, H T e Zuniga-Pflucker, J C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:649-79.
- Petros, A M, Olejniczak, E T e Fesik, S W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 1;1644(2-3):83-94.

- Pierschbacher, M D e Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984 May 3-9;309(5963):30-3.
- Planelles, L, Thomas, M C, Maranon, C, Morell, M e Lopez, M C. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jan;131(1):41-7.
- Pribila, J T, Quale, A C, Mueller, K L e Shimizu, Y. Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:157-80.
- Procopio, D O, Barros, H C e Mortara, R A. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Cell Biol*. 1999 Dec;78(12):911-24.
- Radtke, F, Wilson, A, Stark, G, Bauer, M, van Meerwijk, J, MacDonald, H R e Aguet, M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. 1999 May;10(5):547-58.
- Rassi, A, Jr., Rassi, A e Marin-Neto, J A. Chagas disease. *Lancet*. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402.
- Rey, R C, Monteverde, D A e Sica, R E. Cardiac sources of cerebral embolism. *Arch Neurol*. 1991 Apr;48(4):359-60.
- Ribeiro-Carvalho, M M, Lima-Quaresma, K R, Mouco, T, Carvalho, V F, Mello-Coelho, V e Savino, W. Triiodothyronine modulates thymocyte migration. *Scand J Immunol*. 2007 Jul;66(1):17-25.
- Ribeiro-dos-Santos, R, Pirmez, C e Savino, W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. *Res Immunol*. 1991 Feb;142(2):134-7.
- Ritter, M A e Palmer, D B. The human thymic microenvironment: new approaches to functional analysis. *Semin Immunol*. 1999 Feb;11(1):13-21.
- Rizzo, L V, Cunha-Neto, E e Teixeira, A R. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1989 Sep;57(9):2640-4.

- Rocha, B, Lehuen, A e Papiernik, M. IL-2-dependent proliferation of thymic accessory cells. *J Immunol*. 1988 Feb 15;140(4):1076-80.
- Rodewald, H R. Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:355-88.
- Roggero, E, Perez, A R, Tamae-Kakazu, M, Piazzon, I, Nepomnaschy, I, Besedovsky, H O, Bottasso, O A e del Rey, A. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol*. 2006 Aug;190(2):495-503.
- Rothenberg, E V, Moore, J E e Yui, M A. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):9-21.
- Rupnarain, C, Dlamini, Z, Naicker, S e Bhoola, K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biol Chem*. 2004 Jun;385(6):449-64.
- Rutella, S, Rumi, C, Lucia, M B, Barberi, T, Puggioni, P L, Lai, M, Romano, A, Cauda, R e Leone, G. Induction of CD69 antigen on normal CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells. *Cytometry*. 1999 Jun 15;38(3):95-101.
- Salmena, L e Hakem, R. Caspase-8 deficiency in T cells leads to a lethal lymphoinfiltrative immune disorder. *J Exp Med*. 2005 Sep 19;202(6):727-32.
- Salmena, L, Lemmers, B, Hakem, A, Matysiak-Zablocki, E, Murakami, K, Au, P Y, Berry, D M, Tamblyn, L, Shehabeldin, A, Migon, E, Wakeham, A, Bouchard, D, Yeh, W C, McGlade, J C, Ohashi, P S e Hakem, R. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev*. 2003 Apr 1;17(7):883-95.
- Saraste, A e Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37.
- Sasaki, T, Fassler, R e Hohenester, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol*. 2004 Mar 29;164(7):959-63.
- Savino, W. The elastic system in the thymus of the opossum *Didelphis marsupialis aurita*. *Anat Anz*. 1982;151(1):70-3.

- Savino, W. The thymic microenvironment in infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Jul-Sep;85(3):255-60.
- Savino, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog*. 2006 Jun;2(6):e62.
- Savino, W, Ayres Martins, S, Neves-dos-Santos, S, Smaniotto, S, Ocampo, J S, Mendes-da-Cruz, D A, Terra-Granado, E, Kusmenok, O e Villa-Verde, D M. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? *Braz J Med Biol Res*. 2003 Aug;36(8):1015-25.
- Savino, W e Berrih, S. Thymic extracellular matrix in myasthenia gravis. *Lancet*. 1984 Jul 7;2(8393):45-6.
- Savino, W, Boitard, C, Bach, J F e Dardenne, M. Studies on the thymus in nonobese diabetic mouse. I. Changes in the microenvironmental compartments. *Lab Invest*. 1991 Mar;64(3):405-17.
- Savino, W, Dalmau, S R e Dealmeida, V C. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. *Dev Immunol*. 2000;7(2-4):279-91.
- Savino, W, Dardenne, M e Bach, J F. Thymic hormone containing cells. II. Evolution of cells containing the serum thymic factor (FTS or thymulin) in normal and autoimmune mice, as revealed by anti-FTS monoclonal antibodies. Relationship with Ia bearing cells. *Clin Exp Immunol*. 1983 Apr;52(1):1-6.
- Savino, W, Dardenne, M, Velloso, L A e Dayse Silva-Barbosa, S. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr*. 2007a Oct;98 Suppl 1:S11-6.
- Savino, W, de Moraes Mdo, C, Barbosa, S D, Da Fonseca, E C, De Almeida, V C e Hontebeyrie-Joscowicz, M. Is the thymus a target organ in infectious diseases? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 5:73-8.
- Savino, W, Itoh, T, Imhof, B A e Dardenne, M. Immunohistochemical studies on the phenotype of murine and human thymic stromal cell lines. *Thymus*. 1986;8(4):245-56.

- Savino, W, Leite-de-Moraes, M C, Hontebeyrie-Joskowicz, M e Dardenne, M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. Eur J Immunol. 1989 Sep;19(9):1727-33.
- Savino, W, Mendes-da-Cruz, D A, Silva, J S, Dardenne, M e Cotta-de-Almeida, V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? Trends Immunol. 2002 Jun;23(6):305-13.
- Savino, W, Mendes-Da-Cruz, D A, Smaniotto, S, Silva-Monteiro, E e Villa-Verde, D M. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. J Leukoc Biol. 2004 Jun;75(6):951-61.
- Savino, W, Villa-Verde, D M e Lannes-Vieira, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation? Immunol Today. 1993 Apr;14(4):158-61.
- Savino, W, Villa-Verde, D M, Mendes-da-Cruz, D A, Silva-Monteiro, E, Perez, A R, Aoki Mdel, P, Bottasso, O, Guinazu, N, Silva-Barbosa, S D e Gea, S. Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. Cytokine Growth Factor Rev. 2007b Feb-Apr;18(1-2):107-24.
- Schmitt, T M, Ciofani, M, Petrie, H T e Zuniga-Pflucker, J C. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. J Exp Med. 2004 Aug 16;200(4):469-79.
- Schnare, M, Barton, G M, Holt, A C, Takeda, K, Akira, S e Medzhitov, R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol. 2001 Oct;2(10):947-50.
- Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol Cell. 2002 Mar;9(3):459-70.
- Shoda, L K, Kegerreis, K A, Suarez, C E, Roditi, I, Corral, R S, Bertot, G M, Norimine, J e Brown, W C. DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. Infect Immun. 2001 Apr;69(4):2162-71.

- Silva-Barbosa, S D, Cotta-de-Almeida, V, Riederer, I, De Meis, J, Dardenne, M, Bonomo, A e Savino, W. Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. J Immunol. 1997 Jul 15;159(2):997-1003.
- Silva-Monteiro, E, Reis Lorenzato, L, Kenji Nihei, O, Junqueira, M, Rabinovich, G A, Hsu, D K, Liu, F T, Savino, W, Chammass, R e Villa-Verde, D M. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 2007 Feb;170(2):546-56.
- Silva, A A, Roffe, E e Lannes-Vieira, J. Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infection. Braz J Med Biol Res. 1999 May;32(5):593-600.
- Silva, J S, Morrissey, P J, Grabstein, K H, Mohler, K M, Anderson, D e Reed, S G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med. 1992 Jan 1;175(1):169-74.
- Silva, J S, Twardzik, D R e Reed, S G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). J Exp Med. 1991 Sep 1;174(3):539-45.
- Singer, K H, Denning, S M, Whichard, L P e Haynes, B F. Thymocyte LFA-1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. J Immunol. 1990a Apr 15;144(8):2931-9.
- Singer, K H, Le, P T, Denning, S M, Whichard, L P e Haynes, B F. The role of adhesion molecules in epithelial-T-cell interactions in thymus and skin. J Invest Dermatol. 1990b Jun;94(6 Suppl):85S-90S.
- Soares, M B, Silva-Mota, K N, Lima, R S, Bellintani, M C, Pontes-de-Carvalho, L e Ribeiro-dos-Santos, R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. Am J Pathol. 2001 Aug;159(2):703-9.

- Sohn, S J, Thompson, J e Winoto, A. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Curr Opin Immunol.* 2007 Oct;19(5):510-5.
- Sprent, J, Kishimoto, H, Cai, Z, Surh, C D, Brunmark, A, Jackson, M R e Peterson, P A. The thymus and T cell death. *Adv Exp Med Biol.* 1996;406:191-8.
- Sprent, J, Lo, D, Gao, E K e Ron, Y. T cell selection in the thymus. *Immunol Rev.* 1988 Jan;101:173-90.
- Starr, T K, Jameson, S C e Hogquist, K A. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:139-76.
- Stutman, O, Yunis, E J e Good, R A. Thymus: an essential factor in lymphoid repopulation. *Transplant Proc.* 1969 Mar;1(1):614-5.
- Su, H, Bidere, N, Zheng, L, Cubre, A, Sakai, K, Dale, J, Salmena, L, Hakem, R, Straus, S e Lenardo, M. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science.* 2005 Mar 4;307(5714):1465-8.
- Sun, Z, Unutmaz, D, Zou, Y R, Sunshine, M J, Pierani, A, Brenner-Morton, S, Mebius, R E e Littman, D R. Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science.* 2000 Jun 30;288(5475):2369-73.
- Sundqvist, K G, Pedari, L e Hauzenberger, D. Anchorage and lymphocyte function: extracellular matrix substrata control morphogenesis and interleukin production but have minor effects on DNA synthesis. *Scand J Immunol.* 1993 Mar;37(3):295-307.
- Suniara, R K, Jenkinson, E J e Owen, J J. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J Exp Med.* 2000 Mar 20;191(6):1051-6.
- Tait, S W e Green, D R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Sep;11(9):621-32.
- Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):127-35.
- Takahama, Y, Saito, T, Kawamoto, H, Itoi, M, Boyd, R L, Chidgey, A, Zamoyska, R, Hollander, G A, Anderson, G, Taylor, N, Petrie, H T e Nikolich-Zugich, J. The Global Thymus Network: past, present and future. *Trends Immunol.* 2009 May;30(5):191-2.

- Talvani, A, Ribeiro, C S, Aliberti, J C, Michailowsky, V, Santos, P V, Murta, S M, Romanha, A J, Almeida, I C, Farber, J, Lannes-Vieira, J, Silva, J S e Gazzinelli, R T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 2000 Jul;2(8):851-66.
- Tarleton, R L. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*. 2003 Oct;19(10):447-51.
- Tarleton, R L, Koller, B H, Latour, A e Postan, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):338-40.
- Tarleton, R L, Sun, J, Zhang, L e Postan, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun*. 1994 May;62(5):1820-9.
- Taylor, R C, Cullen, S P e Martin, S J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):231-41.
- Teixeira, M M, Gazzinelli, R T e Silva, J S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002 Jun;18(6):262-5.
- Thesleff, I, Jalkanen, M, Vainio, S e Bernfield, M. Cell surface proteoglycan expression correlates with epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Dev Biol*. 1988 Oct;129(2):565-72.
- Thompson, J, Burger, M L, Whang, H e Winoto, A. Protein kinase C regulates mitochondrial targeting of Nur77 and its family member Nor-1 in thymocytes undergoing apoptosis. *Eur J Immunol*. 2010 Jul;40(7):2041-9.
- Timpl, R e Aumailley, M. Biochemistry of basement membranes. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1989;18:59-76.
- Timpl, R, Rohde, H, Robey, P G, Rennard, S I, Foidart, J M e Martin, G R. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*. 1979 Oct 10;254(19):9933-7.

- Todeschini, A R, Nunes, M P, Pires, R S, Lopes, M F, Previato, J O, Mendonca-Previato, L e DosReis, G A. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J Immunol.* 2002 May 15;168(10):5192-8.
- Tsuruda, T, Costello-Boerrigter, L C e Burnett, J C, Jr. Matrix metalloproteinases: pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev.* 2004 Jan;9(1):53-61.
- Ueno, T, Hara, K, Willis, M S, Malin, M A, Hopken, U E, Gray, D H, Matsushima, K, Lipp, M, Springer, T A, Boyd, R L, Yoshie, O e Takahama, Y. Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity.* 2002 Feb;16(2):205-18.
- Utsumi, K, Sawada, M, Narumiya, S, Nagamine, J, Sakata, T, Iwagami, S, Kita, Y, Teraoka, H, Hirano, H, Ogata, M e et al. Adhesion of immature thymocytes to thymic stromal cells through fibronectin molecules and its significance for the induction of thymocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jul 1;88(13):5685-9.
- Vago, A R, Macedo, A M, Adad, S J, Reis, D D e Correa-Oliveira, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.* 1996 Sep 28;348(9031):891-2.
- van Ewijk, W. The thymus: "Interactive teaching during lymphopoiesis". *Immunol Lett.* 2011 Jul;138(1):7-8.
- Verhagen, A M, Ekert, P G, Pakusch, M, Silke, J, Connolly, L M, Reid, G E, Moritz, R L, Simpson, R J e Vaux, D L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):43-53.
- Vicente, A, Varas, A, Sacedon, R e Zapata, A G. Histogenesis of the epithelial component of rat thymus: an ultrastructural and immunohistological analysis. *Anat Rec.* 1996 Apr;244(4):506-19.
- Villa-Verde, D M, Lagrota-Candido, J M, Vannier-Santos, M A, Chammas, R, Brentani, R R e Savino, W. Extracellular matrix components of the mouse thymus

- microenvironment. IV. Modulation of thymic nurse cells by extracellular matrix ligands and receptors. *Eur J Immunol.* 1994 Mar;24(3):659-64.
- Villa-Verde, D M, Mello-Coelho, V, Lagrota-Candido, J M, Chammas, R e Savino, W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. *Braz J Med Biol Res.* 1995 Aug;28(8):907-12.
- Villa-Verde, D M, Silva-Monteiro, E, Jasiulionis, M G, Farias-De-Oliveira, D A, Brentani, R R, Savino, W e Chammas, R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol.* 2002 May;32(5):1434-44.
- Villalta, F, Scharfstein, J, Ashton, A W, Tyler, K M, Guan, F, Mukherjee, S, Lima, M F, Alvarez, S, Weiss, L M, Huang, H, Machado, F S e Tanowitz, H B. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol Res.* 2009 Jun;104(6):1251-60.
- Villalta, F, Zhang, Y, Bibb, K E, Kappes, J C e Lima, M F. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun.* 1998 Oct;66(10):4690-5.
- Vollger, L W, Tuck, D T, Springer, T A, Haynes, B F e Singer, K H. Thymocyte binding to human thymic epithelial cells is inhibited by monoclonal antibodies to CD-2 and LFA-3 antigens. *J Immunol.* 1987 Jan 15;138(2):358-63.
- von Boehmer, H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. *Adv Immunol.* 2004;84:201-38.
- von Boehmer, H, Aifantis, I, Gounari, F, Azogui, O, Haughn, L, Apostolou, I, Jaeckel, E, Grassi, F e Klein, L. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev.* 2003 Feb;191:62-78.
- Von Gaudecker, B, Kendall, M D e Ritter, M A. Immuno-electron microscopy of the thymic epithelial microenvironment. *Microsc Res Tech.* 1997 Aug 1;38(3):237-49.
- Wakim, L M e Bevan, M J. From the thymus to longevity in the periphery. *Curr Opin Immunol.* 2010 Jun;22(3):274-8.

- Walsh, C M, Wen, B G, Chinnaiyan, A M, O'Rourke, K, Dixit, V M e Hedrick, S M. A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity*. 1998 Apr;8(4):439-49.
- Wanderley, J L, Moreira, M E, Benjamin, A, Bonomo, A C e Barcinski, M A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1834-9.
- Wang, X, Hsu, H C, Wang, Y, Edwards, C K, 3rd, Yang, P, Wu, Q e Mountz, J D. Phenotype of genetically regulated thymic involution in young BXD RI strains of mice. *Scand J Immunol*. 2006 Sep;64(3):287-94.
- Wekerle, H e Ketelsen, U P. Thymic nurse cells--Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature*. 1980 Jan 24;283(5745):402-4.
- Wekerle, H, Ketelsen, U P e Ernst, M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J Exp Med*. 1980 Apr 1;151(4):925-44.
- Wickstrom, S A e Fassler, R. Regulation of membrane traffic by integrin signaling. *Trends Cell Biol*. 2011 May;21(5):266-73.
- Wierzbicka-Patynowski, I e Schwarzbauer, J E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*. 2003 Aug 15;116(Pt 16):3269-76.
- Woo, M, Hakem, R, Soengas, M S, Duncan, G S, Shahinian, A, Kagi, D, Hakem, A, McCurrach, M, Khoo, W, Kaufman, S A, Senaldi, G, Howard, T, Lowe, S W e Mak, T W. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev*. 1998 Mar 15;12(6):806-19.
- Worth, A, Thrasher, A J e Gaspar, H B. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol*. 2006 Apr;133(2):124-40.
- Yoshida, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int*. 2008 Jun;57(2):105-9.

- Yu, X Z, Martin, P J e Anasetti, C. CD28 signal enhances apoptosis of CD8 T cells after strong TCR ligation. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3002-6.
- Yurchenco, P D e Schittny, J C. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990 Apr 1;4(6):1577-90.
- Zhang, J, Gong, Y, Shao, X, Zhang, R, Xu, W, Chu, Y, Wang, Y e Xiong, S. Asynchronism of thymocyte development in vivo and in vitro. *DNA Cell Biol.* 2007a Jan;26(1):19-27.
- Zhang, L, Sun, L e Zhao, Y. Thymic epithelial progenitor cells and thymus regeneration: an update. *Cell Res.* 2007b Jan;17(1):50-5.
- Zhang, L e Tarleton, R L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol.* 1996a Jan;26(1):102-9.
- Zhang, L e Tarleton, R L. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol.* 1996b Nov;84(2):203-13.
- Zhang, N, Hartig, H, Dzhagalov, I, Draper, D e He, Y W. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res.* 2005 Oct;15(10):749-69.
- Zuniga-Pflucker, J C. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jan;4(1):67-72.
- Zuniga, E, Motran, C C, Montes, C L, Yagita, H e Gruppi, A. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J Immunol.* 2002 Apr 15;168(8):3965-73.

10 ANEXOS

10.1 Artigos científicos em colaboração, publicados durante a realização da tese

Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease

Alexandre Morrot, Eugênia Terra-Granado, Ana Rosa Pérez, Suse Dayse Silva-Barbosa, Novica M. Milićević, **Désio Aurélio Farias-de-Oliveira**, Luiz Ricardo Berbert, Juliana De Meis, Christina Maeda Takiya, Juan Beloscar, Xiaoping Wang, Vivian Kont, Pärt Peterson, Oscar Bottasso, Wilson Savino. PLoS Neglected Tropical Disease (2011) 5(8): e1268.