

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LUIZ RICARDO BERBERT

**IMPACTO DA SUPEREXPRESSÃO DA PROTEÍNA PRION CELULAR
SOBRE O SISTEMA IMUNE: CORRELAÇÃO COM MAIOR
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO
*Trypanosoma cruzi***

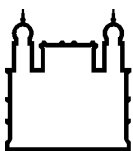
Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de mestre em Biologia
Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz,
Fiocruz, Rio de Janeiro

Orientadores: Wilson Savino

Suse Dayse Silva-Barbosa

RIO DE JANEIRO

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LUIZ RICARDO BERBERT

**IMPACTO DA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA PRION CELULAR
SOBRE O SISTEMA IMUNE: CORRELAÇÃO COM MAIOR
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO
*Trypanosoma cruzi***

Orientadores: Wilson Savino
Suse Dayse Silva-Barbosa

Aprovada em:

Examinadores:

Dr. Vinícius Cotta-de-Almeida - **Presidente**

Dra. Adriana Bonomo

Dra. Cecília Jacques-de-Almeida

Rio de Janeiro, 11 de agosto de 2010

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

B484

Berbert, Luiz Ricardo.

Impacto da superexpressão da Proteína Prion Celular sobre o sistema imune: correlação com maior susceptibilidade à infecção experimental pelo *Trypanosoma Cruzi* / Luiz Ricardo Berbert. – Rio de Janeiro, 2010. xv, 84 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2010.

Bibliografia: f. 56-69

1. *Trypanosoma Cruzi*. 2. Proteína Prion Celular (PrPc). 3. Sistema imunológico. I. Título.

CDD 616.9363

*Dedico este trabalho a minha companheira
de todo o sempre Deborah Leite.*

“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram.”

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”
Charles Darwin

“A vida é apenas uma visão momentânea das maravilhas deste assombroso universo, e é triste que tantos se desgastem sonhando com fantasias espirituais.”
Carl Sagan

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

“Se os fatos não se encaixam na teoria, modifique os fatos.”
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais (Luiz e Angela) e amigos extra laboratoriais (Marcelo e Mônica, Serginho e Tânia, Oliveira e família) pelo apoio e paciência ao longo do tempo.

À minha companheira de todo o sempre Deborah, que durante todo o desenvolvimento desse trabalho me deu amizade, carinho e teve extrema paciência com minha ausência e meu mau humor. Além disso, agradeço muuuito por ter sido a "designer" oficial dessa dissertação, coisa que sozinho eu não faria.

Ao meu orientador, Wilson Savino, pelo conjunto da obra, que desde minha entrada no laboratório me forneceu a base e o aprendizado para conseguir realizar este projeto dentre outras coisas. Agradeço por todas as oportunidades e espero continuar tendo esse apoio durante minha vida profissional.

À minha co-orientadora Suse, não só pelo aprendizado e oportunidades, mas também pelas conversas fora do trabalho, que me ajudaram muito.

Ao revisor desse trabalho e membro da banca, Dr. Vinícius Cotta-de-Almeida, por ter aceitado o convite e me auxiliado com excelência neste projeto, com suas sugestões e críticas.

Aos membros da banca, Dra Adriana Bonomo e Dra Cecília de Almeida pelas críticas e sugestões que serão certamente muito construtivas para meu desenvolvimento.

Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Ingo, Juliana de Meis, Dumith, Daniela, Déa, Morrot, Carla e Eliane. O que seria de mim se não tivesse aprendido com vocês.

À Sidneia, pela eficiência e socorro sempre que precisei, pelo cafezinho e bate papo, e por fazer parte dessa equipe.

Ao Désio, por não só me ensinar a trabalhar com *Trypanosoma cruzi* e aprender as boas práticas de laboratório, mas também pelas conversas sobre todos os assuntos.

Aos timócitos que migraram e que ainda não migraram, Klayza, Marco, Marcelle, Eugênia, Wallace, Flávia Calmon, Cecília, Fernanda, Bárbara (minha afilhada), Fausto,

Natália, Patrícia Ocampo, Tininha e Leandra. Pela amizade de poucos anos, mas que pra mim teve vital importância no modo como vivi no laboratório. Por todas as brincadeiras, conversas, trabalhos, viagens, etc, etc. A confiança e a solidariedade mútuas me levaram onde estou hoje na profissão.

Às meninas mais bonitas da FIOCRUZ, Ailin, Ana Flávia, Ariany, Carol, Danielle, Ednéia, Flávia, Júlia, Juliana, Luciana, Marina e Sabina. Por tudo que conversamos e aprendemos juntos, por me animar quando estava desanimado, por toda a diversão e pelos milhares de almoços e lanchinhos na cantina, enfim, pela amizade completa.

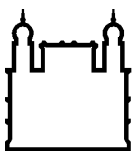
Aos amigos Tiago, Eduardo Régis, Eduardo Samo Gudo, Pedro Ferreira, Pedro Panzenhagen, Vítor, Douglas, Jairo e Ricardo pelo companheirismo e por me fazer rir muitas vezes.

Ao Valmir e Celso por seu excelente trabalho, pela amizade e sua experiência nessa instituição.

À equipe do biotério do Pavilhão 26, por seu suporte e pela simpatia no atendimento.

À Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela sua equipe competente e qualificada.

Às agências financiadoras do projeto, IOC e CAPES.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

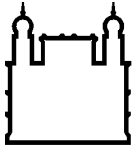
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMPACTO DA SUPEREXPRESSION DA PROTEÍNA PRION CELULAR SOBRE O SISTEMA IMUNE: CORRELAÇÃO COM MAIOR SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RESUMO

A proteína príon celular (PrP^c) é uma glicoproteína constitutivamente expressa no sistema nervoso, bem como no sistema imune, porém, seu papel fisiológico e em processos infecciosos é pouco compreendido. Dados prévios da literatura sugerem disfunções fisiológicas no sistema imune em modelos murinos transgênicos que superexpressam essa proteína podendo levar os mesmos a um processo de imunodeficiência mediante infecções. Para testar essa hipótese, este projeto tem o objetivo de avaliar o impacto da infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos que superexpressam (TG20) ou não expressam PrP^c (KO), analisando parâmetros de infecção correlacionados com a infiltração linfocitária no tecido cardíaco. Nossos resultados demonstram que a superexpressão de PrP^c em camundongos gera inicialmente susceptibilidade do modelo à infecção se comparado ao grupo que não expressa a proteína, conforme observado nas taxas de sobrevivência e parasitemia. A presença de células T, B, bem como células CD11b⁺ de infiltrado inflamatório é numericamente maior no grupo TG20, porém, esse evento não parece estar relacionado diretamente com alterações observadas no baço e linfonodos desses animais durante cinética de infecção; em relação à expressão de moléculas de ativação linfócitos nestes modelos, observamos aumento das mesmas nas subpopulações linfocitárias do grupo TG20. No timo dos modelos TG20 foram observadas alterações fenotípicas, bem como aumento de expressão de laminina e fibronectina e seus receptores nos timócitos. Os dados deste trabalho demonstram que PrP^c tem um grande impacto na fisiologia da infecção pelo *T. cruzi* no modelo murino que superexpressa essa proteína, correlacionando esse evento a uma imunodeficiência previamente observada no mesmo modelo não infectado.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMPACT OF CELULAR PRION PROTEIN OVEREXPRESSION ON IMMUNE SYSTEM: CORRELATION WITH HIGHER SUSCEPTIBILITY DURING EXPERIMENTAL *Trypanosoma cruzi* INFECTION

MASTER THESIS

ABSTRACT

Cellular Prion Protein (PrP^c) is a glycoprotein constitutively expressed in nervous and immune systems, but its physiological role is not well understood. Previous data suggest that murine models which overexpress PrP^c show physiological disfunctions that could be related with a possible immunodeficiency, which might lead to poor immune response against infections. To support this hypothesis, this project has the aim to evaluate the impact of experimental *T. cruzi* infection in mice that overexpress or do not express PrP^c, correlating infection parameters to lymphocyte infiltration on heart tissue. Our results demonstrated that PrP^c overexpression in mice leads to animal susceptibility during acute infection when compared to KO group, comparing survival and parasitemia rates on these groups. Inflammatory infiltrate cells such as T and B lymphocytes, as well as CD11b⁺ cells are present in higher numbers in TG20 model, but it seems to be not correlated with spleen and lymph nodes alterations during infection kinetics; activation molecules are highly expressed in TG20 peripheral lymphocytes. TG20 mouse thymus showed phenotypic alterations, as well as higher expression of laminin and fibronectin and its receptors in thymocytes, which could be possibly related to immature thymocyte exportation and their presence in heart tissue. Those data suggest that PrP^c has an important impact during *T. cruzi* infection in murine model that overexpress PrP^c, correlating these alterations to previous immunodeficiency in non infected TG20 murine models.

ÍNDICE

Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
1.1. Prion e proteína prion celular	1
1.1.1. <i>Características Gerais</i>	2
1.1.2. <i>Distribuição celular e tecidual da proteína prion celular</i>	3
1.1.3. <i>Interações e Funções de PrP^C</i>	4
1.1.4. <i>Interações e funções da proteína prion celular no sistema imune</i>	6
1.1.5. <i>Possível papel de PrP^C em infecções</i>	9
1.2. Doença de Chagas e infecção experimental	10
1.2.1. <i>O sistema imune na Doença de Chagas</i>	13
1.2.3.1. <i>Timo e infecção chagásica</i>	16
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. Material e Métodos	19
3.1. Animais	19
3.2. Parasita e infecções	19
3.3. Parasitemia	20
3.4. Curva de sobrevivência	20
3.5. Reagentes e Anticorpos	20
3.6. Histologia convencional	21

3.7. Imunohistoquímica	21
3.8. Celularidade e Citometria de Fluxo	22
3.9. Análise Estatística	23
4. Resultados	24
4.1. A superexpressão de PrP ^C está associada à diminuição de sobrevivência e aumento da parasitemia dos animais infectados por <i>T. cruzi</i>	24
4.2. Aumento do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de animais transgênicos para PrP ^C , e submetidos à infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	25
4.3. Impacto da proteína PrP ^C na celularidade e fenótipo de linfócitos de órgãos linfóides periféricos (baço e linfonodos subcutâneos) após infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	32
4.4. Atrofia tímica durante infecção pelo <i>T. cruzi</i> nos animais com diferentes níveis de expressão de PrP ^C	40
4.5. Expressão de moléculas de matriz extracelular no timo e de seus receptores em timócitos de camundongos expressando diferentes níveis de PrP ^C , após infecção experimental . pelo <i>T. cruzi</i>	45
5. Discussão e perspectivas	51
6. Referências Bibliográficas	56

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Modelos estruturais das isoformas de PrP ^C e PrP ^{SC}	3
1.2. Esquema estrutural do complexo multiproteico relacionado à PrP ^C , seus ligantes e seus possíveis papéis em eventos fisiológicos	6
1.3. Estimativa global da população infectada pelo <i>T. cruzi</i>	11
4.1. Queda na sobrevivência de animais transgênicos para PrP ^C , após infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i>	24
4.2 Aumento de parasitemia em camundongos transgênicos para PrP ^C , submetidos à infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	25
4.3. Análise histológica do infiltrado inflamatório em tecido cardíaco durante a infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i> , em animais com diferentes níveis de PrP ^C	27
4.4. Aumento de leucócitos presentes no tecido cardíaco de camundongos transgênicos para PrP ^C , após infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	29
4.5. Deposição de laminina em tecido cardíaco de animais submetidos à infecção aguda e tardia pelo <i>T. cruzi</i>	30
4.6. Deposição de fibronectina em tecido cardíaco de animais submetidos à infecção aguda e tardia pelo <i>T. cruzi</i>	31
4.7. Subpopulações linfocitárias e células CD11b ⁺ no baço de animais com diferentes níveis de PrP ^C , após infecção pelo <i>T. cruzi</i>	33
4.8. Subpopulações linfocitárias e células CD11b ⁺ nos linfonodos subcutâneos de animais com diferentes níveis de PrP ^C , após infecção pelo <i>T. cruzi</i>	34
4.9. Análise de células CD62L ^{LOW} nas subpopulações de linfócitos T no baço e linfonodos subcutâneos, na fase aguda da infecção	36
4.10. Análise da expressão de CD44 ^{HIGH} nas subpopulações de linfócitos T do baço e linfonodos subcutâneos na fase aguda da infecção	37
4.11. Análise da expressão de CD25 ^{LOW} nas subpopulações de linfócitos T do baço e linfonodos subcutâneos na fase aguda da infecção	38

4.12. Análise da expressão de CD25 ^{HIGH} nas subpopulações de linfócitos T do baço e linfonodos subcutâneos na fase aguda da infecção.	39
4.13. Massa relativa e celularidade do timo. em animais com diferentes níveis de PrP ^C infectados e não infectados pelo <i>T. cruzi</i>	41
4.14. Análise do perfil de células duplo positivas (CD4 ⁺ CD8 ⁺) durante cinética de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	42
4.15. Análise das subpopulações celulares intratímicas durante cinética de infecção	43
4.16. Parâmetros gerais das modulações de subpopulações timocitárias durante fase aguda e tardia em animais com diferentes níveis de PrP ^C	44
4.17. Deposição de laminina no timo durante cinética de infecção	46
4.18. Deposição de fibronectina no timo durante cinética de infecção	47
4.19.. Análise citofluorimétrica de subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, e de fenótipo VLA-4 ^{HIGH} , na fase aguda da infecção experimental.....	48
4.20. Análise citofluorimétrica de subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, e de fenótipo VLA-5 ^{HIGH} , na fase aguda da infecção experimental.....	49
4.21. Análise citofluorimétrica de subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, e de fenótipo VLA-6 ^{HIGH} , na fase aguda da infecção experimental.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato, do inglês *Adenosin Tri Phosphate*

BSA – Albumina sérica bovina, do inglês *Bovine Serum Albumin*

CD – grupo de diferenciação, do inglês *Cluster of Differentiation*.

cDNA – Ácido Dexóiribonucleico complementar

ConA - concanavalina A

Cu – Cobre

CWE Camundongos Com níveis normais de PrP^c

CXCL12 – Ligante 12 da porção CXC de quimiocinas, do inglês Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12

CXCR4 – Receptor para quimiocina CXCL12.

Dpi – Dias pós infecção.

EAE - encefalomielite autoimune experimental

ECM – Matriz extracelular, do inglês *Extracellular Matrix*.

GPI - glycosyl-phosphatidylinositol

HD – domínio hidrofóbico da proteína prion celular

HE – Hematoxilina e eosina

HSC – Célula Tronco Hematopoética, do inglês *Hematopoietic Stem Cell*.

IFN γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IL-7R α - Cadeia α do receptor de IL-7

kDa – Kilodalton

LAT – Ligante para Ativação de Células T, do inglês *linker for activation of T cells*

LFA1 – Antígeno Funcional Leucocitário, do inglês *leucocyte function antigen*

LN – Laminina

NCAM - Molécula de adesão neuronal

NK – Células Matadoras Naturais, do inglês *Natural Killer*.

NMR – Ressonância Magnética Nuclear ,do inglês *Nuclear Magnetical Ressonance*

Prion – Partícula infecciosa proteinácea, do Inglês *Proteinaceous Infectious Particle*

Prnp – Gene da proteína prion celular

PrP^c – Proteína prion celular

PrPcKO – Camundongos que não expressam PrP^c

PrP^{Sc} – Proteína prion “scrapie”

S1P – esfingosina-1-fosfato, do Inglês *sphingosine 1 phosphate*

S1P₁ – receptor 1 de esfingosina 1-fosfato, do Inglês *type 1 sphingosine-1- phosphate receptor*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês *Sodium Dodecil Sulfato*

siRNA – RNA de pequena interferência, do Inglês *small interference RNA*)

SNC – Sistema nervoso central

SOD - superóxido-dismutase

TCR – Receptor clonal de células T, do inglês T Cell Receptor.

TEC – Células epiteliais tímicas, do Inglês *Thymic Epithelial Cells*

Tga20 – Camundongo transgênico super-expressando PrP^c

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa , do inglês *Tumor Necrosis Factor Alfa*

TSEs – Encefalopatias espongiformes transmissíveis, do inglês *Transmissible Spongiforms Encephalopatias*

VLA – Antígeno de aparecimento tardio, do Inglês *Very Late Antigen*

VLA-4 – $\alpha 4 \beta 1$ ou CD49d/CD29, receptor de fibronectina e VCAM-1

VLA-5 – $\alpha 5 \beta 1$ ou CD49e/CD29, receptor de fibronectina

VLA-6 – $\alpha 6 \beta 1$ ou CD49f/CD29, receptor de laminina

WT – Camundongo do tipo selvagem, do Inglês *Wild Type*

Zn – Zinco

1. INTRODUÇÃO

A proteína prion celular (PrP^C), além de estar presente em tecidos nervosos, é também expressa de forma constitutiva no sistema imune, tanto no timo quanto em órgãos linfóides secundários. No entanto, seu papel na fisiologia do sistema imune ainda não foi elucidado.

Em trabalhos anteriores de nosso e de outro Laboratório (Jouvin-Marche et al, 2006; Terra-Granado et al, 2007), foi visto que camundongos transgênicos para a PrP^C, os animais chamados Tga20, apresentam uma hipoplasia tímica e número significativamente menor de linfócitos T, tanto em linfonodos quanto em baço. Levantamos assim a hipótese que tais animais tivessem algum tipo de imunodeficiência, que, por exemplo, não os capacitasse a controlar uma infecção.

Na presente dissertação, testamos tal hipótese utilizando o modelo de infecção experimental pelo *T. cruzi*, aguda e tardia.

Com objetivo de facilitar o entendimento do nosso trabalho, e antes de passarmos à descrição detalhada da metodologia usada e dos resultados obtidos, faremos a seguir uma breve introdução, de um lado, sobre aspectos relacionados à proteína prion celular, e de outro lado, características gerais da infecção experimental e respectivas alterações de órgãos linfóides.

1.1.Prion e proteína prion celular

Em 1982, Stanley Prusiner, analisando doenças neurodegenerativas denominadas encefalopatias espongiformes transmissíveis, ou TSEs, tanto em humanos quanto em outros animais, descobriu o agente causador dessas doenças designando-o com a sigla *Prion*, do inglês *Proteinaceous Infectious Particle*, ou partícula infecciosa proteinácea; essa molécula foi definida pelo mesmo como sendo resistente à inativação pela maioria dos procedimentos que modificam ácidos nucléicos. Esse agente infeccioso foi primeiramente isolado por Prusiner a partir do tecido cerebral de hamsters infectados pela isoforma da proteína prion causadora das encefalopatias, primeiramente designada (PrP²⁷⁻³⁰), devido ao seu peso molecular de aproximadamente 27-30 kDa. O isolamento e purificação dessa proteína (Chesebro et al, 1985; Oestch et

al, 1985) a partir de algumas de suas características, como uma sequência de aminoácidos, permitiu a síntese de oligonucleotídeos, o que subsequentemente levou aos clones de cDNA Prp, demonstrando que essa proteína era codificada por um gene constitutivo e conservado do hospedeiro (Prnp), e não da partícula infecciosa. Esses estudos levaram à conclusão de que esse agente infeccioso era um composto protéico, sem a presença de ácidos nucléicos. A partir desse isolamento, foi verificada a existência de duas isoformas dessa proteína, a PrP^C ou príon celular, uma isoforma sensível a proteases e solúvel em detergentes desnaturantes e outra isoforma resistente a proteases e insolúvel em detergentes, denominada PrP^{SC} ou príon *scrapie*. As características e funções da isoforma *scrapie*, a proteína infecciosa, são atualmente bem definidos, porém, em relação à isoforma celular, pouco se sabe sobre suas funções no organismo.

1.1.1 Características Gerais:

A partir dos isolados protéicos de Prusiner, as características físico-químicas do Príon começaram a ser elucidadas primeiramente observando uma alta resistência dessa proteína a tratamentos com radiação ultravioleta, altas temperaturas, hidrólise por cátions, digestão enzimática de proteases e nucleases e tratamento químico com fenol e detergentes (Alper et al, 1967; Bellinger-Kawahara et al, 1987, Prusiner et al, 1982).

Estudos moleculares demonstraram que PrP^C é codificada por um único gene, Prnp, localizado no cromossoma 2 em camundongos e no cromossoma 20 em humanos (Flechsigg & Weissmann, 2004), e consiste de três éxons, sendo que o segundo e o terceiro codificam a proteína através de 250 aminoácidos. É um gene altamente conservado em todos os vertebrados estudados (Rongyan et al, 2008; Wopfner et al, 1999).

Estudos de sua estrutura atômica através de ensaios de ressonância magnética nuclear (NMR) desenvolvidos por Pan et al em 1993 e mais tarde por Riek em 1996, demonstraram que PrP^C possui altos conteúdos de α -hélices (40% da proteína) em sua estrutura (Figura 1.1), bem como poucas folhas β -pregueadas (3% da proteína). Em contraste, a estrutura de PrP^{SC} consiste de 40% de folhas β -pregueadas e 30% de α -

hélices; a existência dessas isoformas está relacionada a alterações pós transcricionais nas estruturas secundárias dessas moléculas. A estrutura de PrP^C também possui dois sítios de glicosilação ancorados à membrana celular em áreas resistentes à detergentes por uma âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol) e um domínio interno hidrofóbico (Warwicker, 2000) que estaria implicado na proteção contra estresse oxidativo (Rambold et al., 2008) bem como uma cauda N-terminal flexível constituída de cinco a oito aminoácidos (Prusiner et al, 1998b), formando ao final uma molécula dimérica, observada em ensaios de cristalização (Knaus et al, 2001).

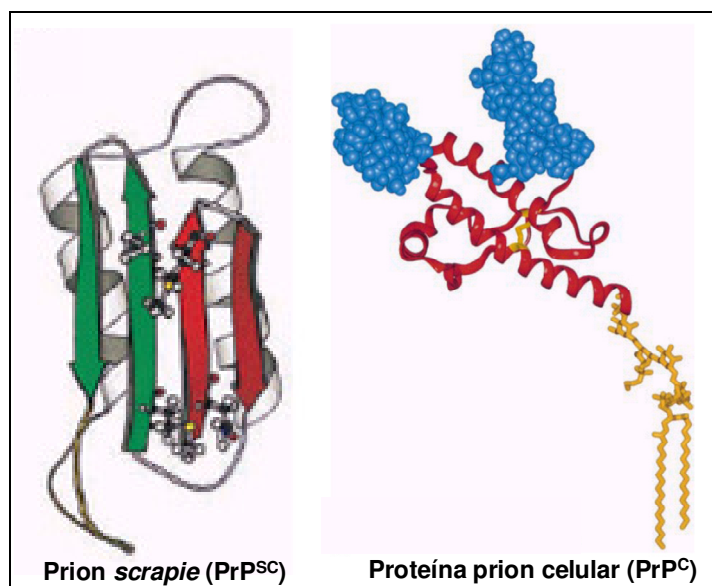


Figura 1.1. Modelos estruturais das isoformas de PrP^C e PrP^{Sc}, apresentando as alterações nas estruturas secundárias. Na isoforma scrapie é observado um número maior de folhas β -pregueadas, já na isoforma celular, a estrutura consiste de três α -hélices e duas folhas antiparalelas. Adaptado a partir de Prusiner (1998).

1.1.2. Distribuição tecidual e celular da proteína prion celular:

Em mamíferos, PrP^C é constitutivamente expressa em diversos tecidos, tais como o nervoso, o muscular e o imune (Revisado por Nicolas et al, 2009). No cérebro, PrP^C é altamente expressa no córtex e cerebelo de adultos, porém, os padrões de acúmulo de PrP^{Sc} nesse órgão são diferentes da distribuição de PrP^C (Taraboulos et al, 1992) levando a crer que a conversão de α -hélices em folhas β -pregueadas na formação de PrP^{Sc} seria um evento essencial na propagação da doença (Pan et al, 1993). Além disso, esse evento ocorreria na superfície celular, e/ou ao longo da via endocítica, através de um mecanismo de polimerização específico, com agregados

ordenados de PrP^{SC} se ligando a PrP^C alterando conformacionalmente PrP^C em mais PrP^{SC}, através de um processo ainda pouco compreendido (Priola & Vorberg, 2006). A distribuição de PrP^C é relacionada a populações celulares distintas nesses tecidos e, entre tais subpopulações, se destacam aquelas envolvidas em interações neuroimunes, incluindo pequenos nervos aferentes na pele e lâmina própria do trato aéreo e digestivo, gânglios e nervos simpáticos, células dendríticas, células dendríticas foliculares e subpopulações de linfócitos ativados particularmente na pele, intestino e tecido linfóide associado aos brônquios (Ford et al, 2002).

PrP^C possui um estrutura dimérica, e estudos celulares desenvolvidos por Stahl em 1987 e Prusiner em 1998 demonstraram que PrP^C é uma proteína de superfície ligada à membrana através de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) e possui dois sítios de glicosilação. Modificações pós-traducionais incluem acoplamento da âncora de GPI e adição de cadeias de oligosacarídeos em Asn 180 e/ou Asn 197 (Ermonval et al., 2003). A molécula de PrP^C final pode não ser glicosilada ou ser mono ou di-glicosilada, com as três formas presentes nos tecidos onde PrP^C é expressa, embora as proporções possam variar. Após a saída do complexo de Golgi, PrP^C é transportada para a superfície celular, onde sua âncora de GPI permite sua entrada preferencialmente em domínios de balsas lipídicas ou *lipid rafts* (Stahl et al, 1987; Taylor & Hooper, 2006). Em neurônios, foi demonstrado que PrP^C é continuamente reciclada entre a superfície celular e compartimentos endossômicos. Foi sugerido que PrP^C saia das balsas lipídicas da membrana para regiões da membrana solúveis em detergente, entre em vesículas endocíticas, e recicle de volta para a superfície através de compartimentos perinucleares. PrP^C também é encontrada em meio extracelular (Borchelt et al, 1993; Harris et al, 1993) originada do desligamento direto de sua âncora GPI da membrana celular (Parizek et al, 2001) ou sendo secretada de exossomas ou microvesículas da membrana (Liu et al, 2002; Mattei et al, 2009; Porto-Carreiro et al, 2005) se apresentando, assim, solúvel no plasma.

1.1.3. Interações e Funções de PrP^C:

Diversos ligantes já foram descritos nas interações com PrP^C, dentre os quais podem-se destacar Hsp60, Bcl-2, Grb-2, Caveolina e ATPases (Revisado por Nicolas

et al, 2009 e Aguzzi & Callela, 2009), porém, as funções fisiológicas dessas interações ainda não estão elucidadas. Uma das moléculas com interação bem definida com PrP^C é o STI-1, um dos inibidores da enzima ATPase Hsp90. Foi demonstrado que a interação PrP^C/STI-1 atua tanto na diferenciação neuronal, utilizando neste processo a via de MAPK, quanto na sobrevivência neuronal, utilizando para isso a via de PKA (Chiarini et al., 2002; Lopes et al., 2005; Zanata et al., 2002). Outro dado que reforça a participação de PrP^C e seu ligante STI-1 na sobrevivência neuronal mostra que estas duas proteínas são produzidas como fatores solúveis por culturas primárias de astrócitos, sendo importantes na sobrevivência neuronal, em modelos de co-cultura (Lima et al, 2007). Outros estudos desenvolvidos por Graner et al (2000) e Gauczynski et al (2001) demonstraram que PrP^C é ligante de alta afinidade ao receptor 67 kDa de laminina na superfície celular e no interior da célula, e, funcionalmente, esta interação modula a adesão neuronal e a extensão e manutenção de neuritos estimulada por laminina (Graner et al, 2000a; 2000b). Esta interação está ainda relacionada à consolidação da memória, sendo essa função mediada pela ativação das vias de sinalização de PKA e ERK1/2 (Coitinho et al, 2006) numa via dependente de laminina. Como PrP^C e laminina são expressos também em outros tecidos, além do SNC, é possível que a ligação entre as duas moléculas seja importante em outros sistemas biológicos, entre os quais o sistema imune, o qual guarda diversas similaridades com o sistema nervoso (Savino & Dardenne, 1995; 2000).

Entre os diversos ligantes de PrP^C já descritos, o cobre (Cu⁺⁺) está entre os mais aceitos, havendo um grande número de trabalhos que descrevem tal ligação e buscam seu papel fisiológico, o qual, no entanto, ainda continua em debate (Davies & Brown, 2008). Um dos trabalhos destaca a baixa deposição de cobre nos cérebros de camundongos nocaute para PrP^C (Herms et al, 1999); outros destacam a participação dessa interação PrP^C/Cu⁺⁺ em eventos de modulação do estresse oxidativo em culturas de neurônios, regulando a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD-1) em via dependente de cobre, além desses neurônios serem mais sensíveis à morte por apoptose (Brown et al, 1997b, 2001; Sorenson, 2001). Embora a ligação de cobre a PrP^C pareça ser importante na resistência celular a estresse oxidativo, os mecanismos ainda são controversos (Linden et al, 2008). A partir dessas interações, tem sido demonstrado que PrP^C pode atuar como molécula sinalizadora em diversos eventos intracelulares.

Em função de suas interações com diferentes ligantes conforme os dados discutidos acima, vemos que PrP^C atua em processos como proteção contra estresse oxidativo, adesão celular, diferenciação, sinalização e sobrevivência neuronal. Dessa forma é possível que PrP^C faça parte de um complexo multiprotéico, conforme elaborado por Martins et al em 2002 (Figura 1.2) e devido à sua localização, possa fazer a conexão de sinais oriundos da matriz extracelular com o interior da célula.

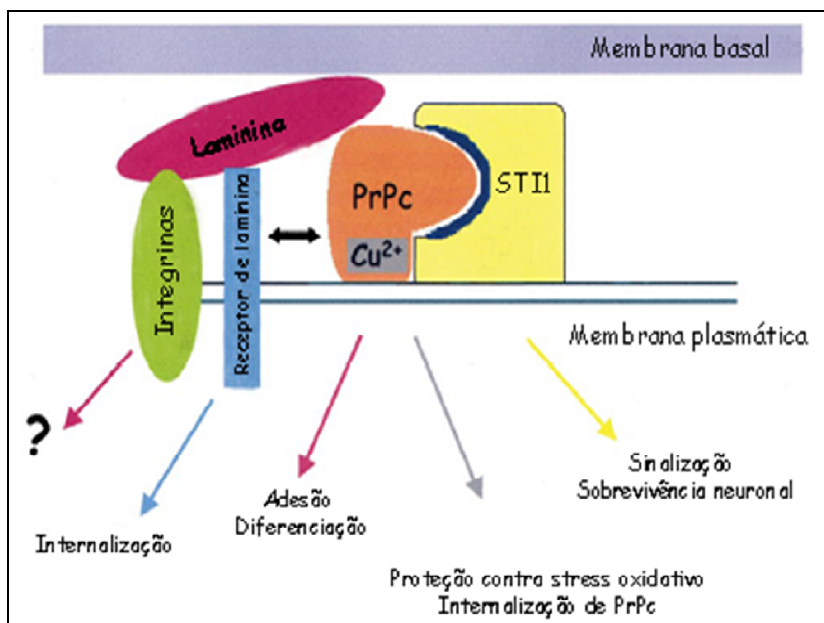


Figura 1.2. Esquema estrutural do complexo multiprotéico relacionado à PrP^C, seus ligantes e seus possíveis papéis em eventos fisiológicos. Setas indicam a interação de PrP^C com a estrutura molecular relacionada e as possíveis conseqüências dessas interações. Modificado a partir de Martins et al (2002).

1.1.4. Interações e funções da proteína prion celular no sistema imune:

Vários trabalhos apontam para a importância de PrP^C na fisiologia do sistema imune (Revisado por Isaacs et al, 2006). Sendo a relação entre prion e sistema imune complexa e ainda muito pouco compreendida, estudos sobre PrP^C no sistema imune podem levar a novos conhecimentos sobre a patogenia periférica das doenças causadas por prion, além de desvendar as funções dessa molécula no sistema imune em condições normais e patológicas.

A expressão de PrP^C no sistema imune já foi demonstrada nos trabalhos de Ford et al (2002) e Liu et al (2001), que, ao analisarem precursores hematopoiéticos,

observaram a presença da proteína em células progenitoras iniciais, megacariócitos, monócitos e granulócitos em diferenciação. Células tronco hematopoiéticas (HSCs) humanas CD34+ também expressam PrP^C, bem como linfócitos e monócitos que mantém esta expressão após diferenciação em células maduras; em granulócitos a expressão de PrP^C diminui durante a diferenciação (Dodelet & Cashman, 1998) conforme observada a não expressão em neutrófilos maduros (Liu et al, 2001). Por outro lado, o amadurecimento de monócitos e células dendríticas leva a um aumento na expressão de PrP^C (Burthem et al, 2001; Durig et al, 2000; Martinez del Hoyo et al, 2006). Em relação a células de órgãos linfóides periféricos, a expressão de PrP^C está relacionada principalmente a células dendríticas foliculares e granulócitos (Cordier-Dirikoc et al, 2008; Ford et al, 2002). Ensaio em modelos murinos sugeriram uma expressão diferencial de PrP^C em linfócitos T e B, sendo bem mais restrita em linfócitos maduros no baço e linfonodos (Kubosaki et al, 2001; Liu et al, 2001). Estudos em linfócitos humanos demonstraram que a expressão de PrP^C em linfócitos T e B no sangue é alta, sendo menor em linfócitos B que em T; nos linfócitos T, a subpopulação T CD4+ expressa níveis mais baixos da proteína em relação à CD8+ (Durig et al, 2000; Politopoulou et al, 2000), bem como a subpopulação de linfócitos T de memória expressa maiores níveis de PrP^C em comparação aos linfócitos T virgens (Liu et al, 2001). Ainda no sangue humano, a expressão da proteína foi observada em células NK (natural killer), plaquetas e monócitos (Isaacs et al, 2006).

Uma das possíveis participações de PrP^C na fisiologia do sistema imune, foi inicialmente descrita durante experimentos *in vitro*, onde se demonstrou que durante ativação de linfócitos T por mitógenos como ConA, fitohemaglutinina ou anticorpo anti-CD3, a expressão de PrP^C é aumentada (Cashman et al, 1990; Liu et al, 2001). Porém, há dados controversos que descrevem uma possível co-localização de PrP^C no complexo TCR/CD3. Alguns trabalhos mostram sua co-localização e/ou imunoprecipitação com moléculas como Fyn, Lck, Zap-70 e CD3 (Mattei et al, 2004; Stuermer et al, 2004; Paar et al, 2007), e outros divergem desses dados, sugerindo que embora PrP^C se acumule em sítios de contato célula T - célula dendrítica durante estímulo via MHC, ele não se co-localize com CD3, LFA-1 (leucocyte function antigen), CD43, LAT (linker for activation of T cells) ou CD90 (Thy1), de acordo com Ballerini et al (2006). Por outro lado, PrP^C pode também ser importante na indução de respostas de células T por células apresentadoras de antígenos, já que células dendríticas que não

expressam PrP^C apresentam menor capacidade de induzir proliferação de células T (Ballerini et al, 2006). Esse dado está de acordo com o aumento da expressão de PrPC em células dendríticas após ativação, juntamente com outros marcadores de ativação como molécula MHC de classe II e CD86 (Ballerini et al, 2006; Martinez del Hoyo et al, 2006). Estudos realizados por Bueler (1992) em camundongos nocaute para PrP^C demonstraram níveis normais de linfócitos ativados com ConA. Além disso, experimentos de proliferação celular com os mesmos animais apresentaram pouca resposta proliferativa (Mazzoni et al, 2005), corroborando a hipótese de que a co-localização PrPc/TCR não induz a uma resposta específica a mitógenos. Por outro lado, dois estudos no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) mostraram exacerbação da doença nos camundongos nocaute (Ingram et al, 2009; Tsutsui et al, 2008) com aumento de infiltrado inflamatório de linfócitos T no tecido nervoso e na produção de citocinas inflamatórias, em comparação aos camundongos controle (Ingram et al, 2009; Tsutsui et al, 2008).

PrP^C é constitutivamente expressa no timo, tanto nas células do seu microambiente quanto nos timócitos (Liu et al, 2001). No microambiente tímico, PrPC foi detectado em células epiteliais do córtex e mais intensamente em células epiteliais tímicas da medula (Ford et al, 2002), além de células dendríticas CD8+ (Martinez del Hoyo et al, 2006) e de células endoteliais (Terra-Granado et al, 2007). Liu et al (2001) e Jouvin-Marche et al (2006) observaram timócitos expressando PrPC em todas as subpopulações analisadas (CD4+, CD8+, CD4-CD8-, e CD4+CD8+). PrP^C já foi descrita anteriormente como tendo possível papel na ativação de células T, na fagocitose e na migração celular e, esses eventos, entre outros, ocorrem em alto grau no timo. Somando isso à alta expressão dessa molécula no órgão, ressalta-se ainda mais um possível papel funcional de PrP^C em processos essenciais como a diferenciação e migração de linfócitos T no timo.

Dados independentes de dois laboratórios (Jouvin-Marche et al, 2006; Terra-Granado et al, 2007; Terra-Granado, 2009) em estudos com camundongos superexpressando PrP^C, demonstraram que os mesmos apresentam intensa hipoplasia tímica, com bloqueio parcial de diferenciação de timócitos no estágio DN3 (de fenótipo CD4-CD8-CD25+CD44-), e diminuição nas subpopulações subseqüentes. Esse fato promove o acúmulo de células duplo negativas para CD4 e CD8 no timo dessa linhagem. As subpopulações duplo-positivas CD4+CD8+, assim como os timócitos

simples positivos CD4+ ou CD8+ do camundongo Tga20 apresentaram aumento de morte celular, explicando em parte o pequeno número de células encontrado nestes estágios de desenvolvimento. Vimos ainda que esses animais, apresentam alterações em respostas migratórias frente a diferentes estímulos, incluindo laminina, fibronectina e a quimiocina CXCL12 (Terra-Granado, 2009).

Esses trabalhos sugerem que PrP^C seja uma molécula envolvida no controle da resposta imune, e mostram ainda o grau de complexidade nas relações intercelulares em que essa molécula pode estar envolvida in vivo (Tsutsui et al, 2008). Assim, é possível que os animais Tga20, superexpressando PrP^C, apresentem algum tipo de imunodeficiência de imunidade celular, e dependente de uma alteração intratímica. Segundo esta hipótese, poderíamos imaginar que tais animais pudessem ter mais susceptibilidade a infecções.

1.1.5. Possível papel de PrP^C em infecções:

O papel de PrP^C em infecções ainda é muito pouco compreendido. No entanto, alguns trabalhos mostram que esta proteína tem impacto imunomodulador e pode controlar ou amplificar a intensidade de alguns processos inflamatórios e infecções virais e bacterianas.

Recentes dados obtidos a partir de infecções experimentais em camundongos nocaute para PrP^C, em modelo de sepse causado por *Streptococcus pyogenes* (Ingram et al, 2009) demonstraram que durante essa infecção, as taxas bacterianas são maiores se comparadas as dos animais controle com níveis normais de PrP^C, e tal aumento pode estar relacionado a um menor aporte de neutrófilos ao sítio de infecção. Ainda neste modelo de infecção, em animais com níveis normais de PrP^C, os antígenos de *S. pyogenes* induzem a uma grande produção de citocinas inflamatórias que podem levar ao choque; nos animais nocaute para PrP^C, foi observada menor produção destas citocinas, o que poderia estar protegendo o indivíduo da infecção.

Trabalhos recentes demonstraram ainda que infecções virais estão diretamente relacionadas e podem ser co-fatores no aumento de expressão de PrP^{SC} nas TSEs (Caruso et al, 2009). A replicação do Cocksackievirus B3 é aumentada em camundongos nocaute devido a uma diminuição da resposta baseada em IFN- γ nesse

modelo, atribuída à ausência de PrP^C (Nakamura et al, 2003). O Vírus da Estomatite Vesicular inoculado em animais normais, elevou a produção de PrP^C em células dendríticas foliculares, por sua vez controlando a replicação viral (Lotscher et al, 2003, 2007). Outras infecções virais experimentais em camundongos nocaute para PrP^C, como a variante B do Vírus da Encefalomiocardite mostraram o possível papel de PrP^C na indução da inflamação e inibição de apoptose durante infecção (Nasu-Nishimura et al, 2008). Dados observados em infecções com Vírus Herpes Simplex demonstraram que a ausência de PrP^C induz à latência desse vírus, e que sua superexpressão induz à replicação viral (Thrackay e Budjoso, 2002).

O impacto de PrP^C em infecções por protozoários ainda não foi estudado. Nesse sentido, na presente dissertação, visamos definir se a superexpressão de PrP^C, que ocorre simultaneamente a importantes distúrbios de geração de linfócitos T, poderia ter influência sobre a susceptibilidade à infecção experimental pelo *T. cruzi*.

1.2. Doença de Chagas e infecção experimental

A Doença de Chagas é uma endoparasitose causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida – Trypanosomatidae) e é endêmica em toda América Latina e sul dos Estados Unidos (Figura 1.3). A Organização Mundial de Saúde relata que existem em torno de 18 milhões de humanos infectados e mais de 100 milhões em risco de infecção (2009). A infecção natural é causada pela picada de um inseto vetor conhecido como Barbeiro (Ordem Hemiptera – Reduviidae) e em alguns casos pela via transplacentária e sexual (Dias, 2000); mas também há outras vias não naturais e acidentais como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, ingestão de alimentos contaminados e acidentes laboratoriais.

Estudos recentes agruparam as diversas cepas de *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas (1 e 2) baseados em análises de rRNA e mini éxons (Souto, 1996). Dentro dessas linhagens há os clonotipos ligados à infecção humana (clonotipo II – Linhagem 1) e reservatórios silvestres (clonotipo I – Linhagem 2) de acordo com Di Noia (2002). A cepa de eleição para realização do presente trabalho (cepa Y) situa-se no clonotipo II, linhagem 1. Quanto à sua distribuição geográfica, o clonotipo II é prevalente na América do Sul, e clonotipo I está restrito à América Central e norte da América do Sul. A

heterogeneidade e multiclonalidade dessas cepas determinam variações nos aspectos clínicos da doença (Devera, 2003). Um novo consenso no agrupamento das diversas cepas de *Trypanosoma cruzi* engloba a cepa Y em nova nomenclatura corrente que subdivide os clonotipos de I a VI dentro de DTUs (Discrete Typing Units), porém, mantendo a cepa como *T. cruzi* II.

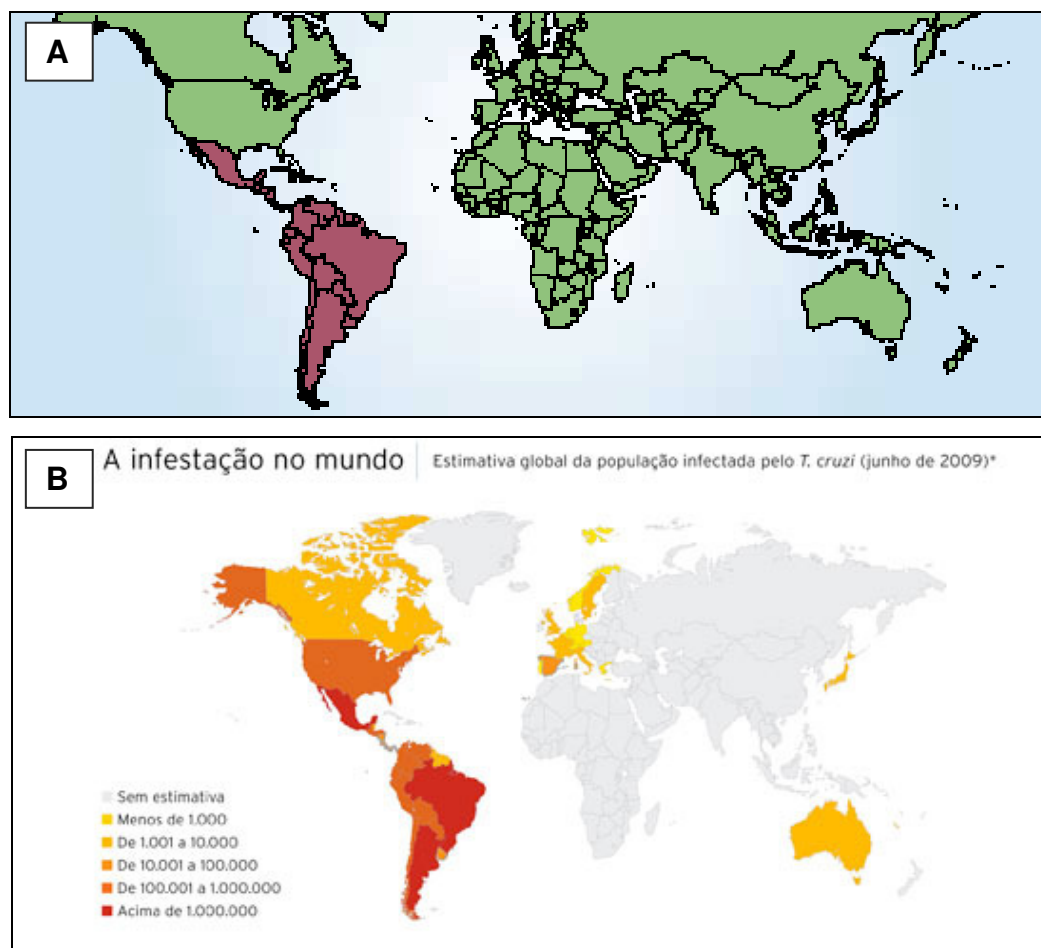


Figura 1.3. Estimativa global da população infectada pelo *T. cruzi*. Os dados atuais da FAPESP (B) demonstram um aumento da região endêmica de humanos infectados pelo *T. cruzi* se comparada aos da Organização Mundial de Saúde de 2007 (A), demonstrando que a epidemia ultrapassou os limites da América Latina, antiga região endêmica. (OMS, 2007; FAPESP, 2009)

O hospedeiro humano infectado pelo parasita passa por duas fases clínicas bem caracterizadas da doença, aguda e crônica. A fase aguda se inicia após a picada do inseto vetor contaminado onde ocorre uma reação inflamatória conhecida como Chagoma de Inoculação que pode se desenvolver para uma forma mais severa com edema e linfadenopatia local (Sinal de Romana) em torno de 7-14 dias (Revisado por Rey, 2002). Após esse período seguem outras manifestações como febre, cefaléia,

anorexia, vômitos , diarreia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e alta parasitemia (Tanowitz et al, 1992) devido à extensa multiplicação de amastigotas no organismo que liberam tripomastigotas no sangue. Uma manifestação clínica importante dessa fase é a cardite causada pelo parasitismo das fibras do miocárdio que levam a uma intensa resposta inflamatória que por sua vez destrói tanto o tecido infectado e não infectado (Luppi et al, 1998; Dias, 2000) e nesse tecido são comumente observados ninhos de amastigotas nas células musculares e glia (Tanowitz et al, 1992; Prata, 2001) Alguns pacientes infectados morrem nessa fase da doença devido às complicações da miocardite e meningoencefalites, mas a maioria se recupera em 3-4 meses. Em alguns casos (50 - 70%), que podem variar com a cepa de *T. cruzi* e a resistência do hospedeiro, a doença se torna assintomática e latente após a fase aguda por até cerca de 20 anos após infecção pois tem prognóstico incerto e pode ou não evoluir para fase crônica (Vitelle-Alvelar et al, 2006).

A fase crônica pode ser assintomática ou apresentar-se, em torno de 30% dos casos, como doença, caracterizada por parasitemia subpatente, cursando com cardiomiopatia, megacólon, ou megaesôfago, e alterações no sistema nervoso periférico, todos resultantes da intensa atividade inflamatória mediada por células T nesses tecidos e persistência de antígenos parasitários circulantes (Tanowitz et al, 2002; Savino et al, 2007). A cardiomiopatia chagásica crônica é uma das manifestações mais importantes na doença e a principal causa de morte nos pacientes após um processo de cardiomegalia, arritmia e falência do órgão (Higuchi et al, 2003).

Durante anos, desde o início dos estudos da Doença de Chagas, diversos modelos foram introduzidos laboratorialmente, dentre eles o rato, o gambá, o coelho, o hamster, o cão e o macaco (Revisado por Araújo-Jorge & De Castro, 2000). No entanto, o modelo mais amplamente utilizado em todo o mundo, pela sua facilidade de manutenção, de infecção experimental e similaridades com a doença humana é o camundongo.

Camundongos suíços não isogênicos, assim como cepas de animais isogênicos (BALB/c, C3H, C57BL/6 e C57BL/10) são os mais utilizados laboratorialmente. Algumas dessas linhagens apresentam resistência à infecção por *T. cruzi* como o C57BL/6 e por isso tem sido utilizado na cronificação dos modelos; já camundongos BALB/c, apesar de serem amplamente utilizados, são mais susceptíveis à infecção, e por isso mais utilizados em experimentos de imunomodulação e testagem de drogas.

É importante salientar ainda a contribuição de diversos trabalhos que utilizam camundongos transgênicos em estudos fisiopatológicos envolvidos com a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Nesse sentido, a utilização de animais com alterações na expressão de moléculas relacionadas à resposta imune, tais como TNF- α e IFN γ , entre outras, por exemplo, tem sido bastante elucidativos.

1.2.1. O sistema imune na Doença de Chagas:

Atualmente, há um consenso de que a resposta imune do hospedeiro induz a diversos eventos complexos que possam controlar o parasitismo enquanto preservam o potencial de montar e manter uma longa resposta celular e humoral contra o patógeno durante a infecção pelo *T. cruzi* (Revisado por Sathler-Avelar, 2009). No curso dessa infecção, são observadas diversas alterações no sistema imune e a evolução desses mecanismos depende inicialmente das características genéticas do hospedeiro e do parasita (Kierszbaum & Sztein, 1990). Por outro lado, a ausência de patologias clínicas durante a infecção em alguns indivíduos está diretamente associada com a habilidade de controle da resposta dos mesmos contra o parasita, porém, esse controle pode contribuir, na evolução da infecção, com danos teciduais associados aos infiltrado inflamatórios leucocitários.

A resposta ao parasita se inicia com a entrada do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro, e com reconhecimento do mesmo pelo sistema imune, podendo gerar três eventos básicos: a detecção e destruição direta do parasita por células do sistema inato; a ativação de células dendríticas e macrófagos, tornando-os apresentadores do antígeno parasitário às células T, desencadeando a resposta adaptativa; e a sensibilização de células não hematopoiéticas que seriam alvos primários na invasão do parasita (Revisado por Tarleton, 2007). Em um primeiro momento, macrófagos, iniciam uma ação microbicida através da produção exacerbada de IFN- γ e TNF- α bem como ativação de células Natural Killer (NK) através de IL-12, estimulando grande produção de óxido nítrico e IFN- γ por essas células que contribuem para o controle inicial da infecção (Lima-Martins et al, 1985; Gazzinelli et al, 1993); essas duas populações celulares evoluem para fenótipos bem distintos durante o curso da fase aguda, antes do início da resposta mediada por células T (Vitelli-Alvelar et al, 2006), e este evento teria relação direta com as respostas futuras, já que sua expansão

exacerbada na doença pode contribuir para eventos pró-inflamatórios. Sendo assim, a modulação de mecanismos imunoreguladores seria importante para prevenir os efeitos deletérios associados com a excessiva estimulação do sistema imune que levariam às morbidades características da doença. Dentre esses mecanismos está a presença e modulação de células T reguladoras (Treg) com fenótipo CD4+CD25^{high} que podem tanto contribuir no controle de autoimunidade mediada por células T quanto na expansão descontrolada de determinada população responsiva a algum patógeno (Piccirillo, 2008). Durante a infecção pelo *T. cruzi*, foram relatadas altas taxas dessas células em pacientes com forma indeterminada da doença, enquanto que pacientes nas fases iniciais e tardias possuíam taxas mais baixas, podendo assim sofrer os danos teciduais característicos (Vitelli-Alvelar, 2005, 2006). Dados obtidos em nosso laboratório demonstraram que essa infecção pode gerar distúrbios na geração e exportação de células Treg naturais, podendo assim contribuir com a evolução da doença (Hamaty, 2008)

Na fase aguda da infecção, observa-se uma intensa ativação policlonal de células T e B que são expandidas em órgãos linfóides periféricos persistindo até a fase crônica da doença (Minoprio, 1986; Da Silva, 1998). Essa ativação é seguida de imunossupressão mediada por células T e macrófagos que induz ao escape e permanência do parasito nos tecidos (Tarleton, 1988). O aumento na produção de óxido nítrico por macrófagos estimula a produção de Fas e FasL em linfócitos levando-os à apoptose (Martins et al, 1999) e podendo levar também a lesões teciduais progressivas características da doença, como a miocardite.

Um ponto amplamente discutido atualmente na patogênese da doença, principalmente em relação à miocardite, é a geração de auto imunidade que pode ser resultante da persistência de antígenos parasitários circulantes oriundos de danos ocorridos nos tecidos (Kalil & Cunha-Neto, 1996), bem como à presença de peptídeos de *T. cruzi* com sequências homólogas à sequências protéicas do hospedeiro, como por exemplo a miosina cardíaca (Cunha-Neto, 1995). Porém, alguns autores discutem que danos ao tecido cardíaco podem ser resultantes da presença do parasito no local, que levam a uma reação inflamatória mediada por células T CD8 específicas (Marin-Neto et al, 2007). A possível participação de auto anticorpos foi demonstrada na detecção de anticorpos anti EVI (Endocardial Vascular Interstitial Tissue) em soro de pacientes chagásicos que reagem contra o próprio endocárdio desses pacientes (Cossio et al,

1974). Células T CD4 têm um papel importante na reação contra o músculo cardíaco como demonstrado por Ribeiro-dos-Santos (1990,1991,1992), onde foi observado que os danos teciduais em corações de camundongos crônicos eram semelhantes aos danos de pacientes transplantados. O tratamento de camundongos com anticorpo anti CD4 evitou a rejeição em transplantes experimentais, o que não ocorreu com tratamento com anti CD8.

Em relação à produção de citocinas durante a infecção, há uma deficiência na quantidade de IL-2 bem como na expressão de seu receptor (CD25) na superfície de linfócitos, inibindo a resposta proliferativa (Tarleton, 1988), mas, por outro lado há um grande aumento na produção de TNF- α IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-12 cuja ação exacerbada promove inflamação (Tarleton, 1991; Tanovitz, 1992). A infecção pelo *T. cruzi* classicamente leva a uma resposta com perfil Th1 que consiste na alta produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, que aumenta a capacidade microbida de macrófagos; porém, alguns modelos apresentam desequilíbrio na produção dessas citocinas durante a infecção e esse mecanismo pode levar a uma resposta com perfil Th2, com produção de IL-4 e IL-10, aumentando a susceptibilidade à infecção

Alterações estruturais e fisiológicas também podem ser observadas em órgãos linfóides, particularmente em camundongos. O aumento de volume no baço e linfonodos subcutâneos foi observado na fase aguda da infecção, resultante da ativação policlonal e proliferação celular nesses órgãos (Minoprio et al, 1986). Já em linfonodos mesentéricos, ocorre efeito inverso, onde há intensa atrofia devido à apoptose dos linfócitos (De Meis et al, 2006). Os subtipos de células T encontrados na periferia incluem modificações fenotípicas, em seus repertórios de TCR e também em seus marcadores de ativação, apresentando maior densidade de CD69 e menor densidade de CD62L (Leite-de-Moraes et al, 1994; Cotta-de-Almeida et al, 2003; Mendes-da-Cruz et al, 2006).

O timo também é um órgão alvo na infecção pelo *T. cruzi* (Savino, 2006), sofrendo diversas alterações no curso da patologia. Sendo um órgão gerador de células T, essas alterações podem estar envolvidas em aspectos distintos da fisiopatologia da doença. Os diversos pontos relacionados ao órgão e sua participação na infecção serão discutidos a seguir.

1.2.1.1 Timo e infecção pelo *T. cruzi*:

Durante a infecção experimental, diversas alterações já foram descritas no timo, sendo este um dos principais alvos durante a infecção (Savino, 2006). Na fase aguda, esse órgão sofre uma intensa atrofia que se estende no decorrer da doença e esse evento é causado principalmente pela depleção maciça de timócitos com fenótipo CD4+CD8+ por apoptose, reduzindo então a região cortical do órgão (Savino et al, 1989, Leite-de-Moraes et al, 1991,1992, Martins et al, 1994).

A apoptose destes timócitos pode ocorrer a partir da modulação de diversas moléculas. Recentes trabalhos demonstraram que essa morte não está diretamente relacionada às moléculas Fas e Perforina, já que experimentos em animais nocaute para essas moléculas demonstraram a mesma perda maciça de timócitos na infecção (Henrique-Pons et al, 2004). Outras moléculas do hospedeiro, como ATP extracelular e galectina-3 (Mantuano-Barradas et al, 2003; Silva-Monteiro et al, 2007) podem estar envolvidos na indução de apoptose em animais infectados. Outra via relacionada com a atrofia pode ainda ser mediada por interações imunoendócrinas: durante a infecção, há uma intensa reação inflamatória mediada por TNF- α que ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6 causando aumento na produção dos glicocorticóides, os quais diretamente envolvidos na atrofia (Perez et al, 2007). Porém, ainda assim, a adrenalectomia em animais infectados não preveniu a depleção timocitária (Leite-de-Moraes et al, 1991). Alguns trabalhos demonstram que a produção de corticóides pelas TECs intratímicas influenciariam nesse processo de morte (Jondal et al, 2004; Cole et al, 2005). A presença do *T. cruzi* no timo principalmente em macrófagos e no epitélio também poderia influenciar a atrofia através da ação enzimática da trans-sialidase do parasita diretamente sobre as células (Gonçalves-da-Costa et al, 1991; Mucci et al, 2002).

Além de eventos apoptóticos, o potencial mitogênico de timócitos durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é inibido, tendo estes uma resposta proliferativa diminuída, com baixa na produção de IL-2, quando estimulados experimentalmente por mitógenos como concanavalina-A e anti-CD3 (Leite-de-Moraes et al, 1994). A atividade citotóxica intratímica também é aumentada na infecção aguda, devido à intensa produção de IL-4, IL-5 e IL-6, bem como IL-10 e IFN- γ , que estariam inibindo a produção de IL-2 diminuindo a resposta proliferativa.

Alterações estruturais no microambiente tímico também ocorrem durante a infecção experimental. A expressão de citoqueratinas em células epiteliais tímicas é desregulada, com expressão medular de citoqueratinas normalmente restritas ao córtex (Savino et al, 1989). Além disso, há um aumento maciço na deposição de colágeno tipo IV, laminina e fibronectina no córtex e medula que por sua vez são simultâneos ao aumento de seus receptores pelos timócitos (VLA-4, VLA-5 e VLA-6) e em outras células do microambiente (Cotta-de-Almeida et al, 1997, 2003).

O aumento da expressão de moléculas como galectina-3 e tenascina também foi descrito durante infecção (Silva-Monteiro et al, 2007; Cotta-de-Almeida et al, 1997). Funcionalmente, o aumento dessas moléculas de ECM, bem como aumento nos níveis intratímicos de CXCL12 e seus receptores (VLAs e CXCR4, respectivamente) induziriam a exacerbação do potencial migratório de timócitos sobre ECM, o que pode levar células CD4+CD8+ autorreativas para órgãos linfóides periféricos (Cotta-de-Almeida, 2003; Mendes-da-Cruz et al, 2006) e coração.

Considerando que os camundongos Tga20, transgênicos para PrP^C, que superexpressam a molécula, apresentam uma hipoplasia tímica e número significativamente menor de linfócitos T, tanto em linfonodos quanto em baço, levantamos a hipótese que tais animais não fossem capazes de controlar uma infecção. Assim, decidimos investigar tal hipótese utilizando o modelo de infecção experimental pelo *T. cruzi*, analisando um modelo que permite a observação da fase aguda e fases mais tardias da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar o impacto da superexpressão ou ausência da proteína prion celular sobre o curso da infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar a sobrevivência e parasitemia no curso da infecção aguda e tardia em camundongos que expressam diferentes níveis de PrP^C;
- Avaliar o grau e o fenótipo do infiltrado inflamatório, e de moléculas de matriz extracelular, no tecido cardíaco, de camundongos que expressam diferentes níveis de PrP^C, submetidos à infecção pelo *T. cruzi*;
- Determinar a celularidade e o fenótipo de linfócitos e células CD11b+ no baço, linfonodos subcutâneos e timo, no curso da infecção experimental, em camundongos que expressam diferentes níveis de PrP^C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos, de 4-5 semanas com inativação do gene Prnp (Prnp0/0), apresentando um fundo genético misto C57BL6/J x 129/Sv (Bueler et al., 1992) denominada tecnicamente como **B6;129S7-Prnptm1Cwe(PrPcKO)**, bem como camundongos transgênicos que expressam em torno de 10 vezes mais PrPc que animais normais, sendo estes denominados **B6;129S7Tg(Prnp)a20Cwe(Tg20)**. Como linhagem controle foram utilizados camundongos da linhagem selvagem **CWE** com o mesmo fundo genético C57/BL6/J x 129/Sv. Neste trabalho, para melhor compreensão e apresentação de nossos resultados, as três linhagem são definidas como **TG20**, para o modelo que superexpressa a proteína; **KO** para o modelo que não expressa a proteína e **CWE** para os modelos normais. Estes três grupos de camundongos foram separados em controles (CT = sem infecção) e infectados. As três linhagens foram gentilmente fornecidas pela Dra Vilma Martins, do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (São Paulo), e foram mantidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz. Todos os procedimentos envolvendo a utilização destes animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório, e estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Parasita e infecções

A cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada foi a "Y" cultivada *in vivo* em camundongos C57BL6/J. As três linhagens de camundongos utilizados no trabalho foram separadas em grupos controle (sem infecção) e infectados onde foi determinada uma cinética de infecção (11DPI, 18 DPI, 90 DPI). Cada animal do grupo infectado recebeu um inócuo de 100 parasitas no volume final de 200µL de solução de PBS.

3.3. Parasitemia

As três linhagens de animais do grupo infectado foram analisadas primeiramente em relação à sua parasitemia, onde cada animal ($n = 10$ animais/grupo), de acordo com a cinética de infecção descrita, teve retirado de sua cauda $5\mu\text{l}$ de sangue. Esse volume foi acondicionado sobre lâmina de vidro, e lamínula de vidro 18×18 mm, onde foram contados ao microscópio ótico de luz com aumento de $40\times$, em cinquenta campos nesta mesma lamínula. O número final de parasitas foi inserido na fórmula própria, de acordo com o método de Pizzi-Brener (Araújo-Jorge TC & Castro SL, 2000) e a média de parasitemia analisada através do Software GraphPad Prism4.03 ® com teste estatístico TwoWay ANOVA e Pós Teste Bonferroni.

3.4. Curva de sobrevivida

As três linhagens de camundongos infectados foram analisadas de acordo com sua sobrevivência mediante dose de infecção (100 parasitas por animal). Em um primeiro experimento, cada gaiola acondicionou 5 animais de cada linhagem ($n = 20$ animais/grupo) e a cada 2 dias foi analisada a taxa de sobrevivência de cada gaiola. Em um segundo experimento, o mesmo procedimento foi realizado, com a diferença que os animais foram mantidos isoladamente, um em cada gaiola.

O número final de animais vivos após cinética de infecção (30 DPI) foi inserido no Software GraphPad Prism4.03 ® e a curva de sobrevivida delineada de acordo com o programa.

3.5. Reagentes e Anticorpos

Os seguintes reagentes foram utilizados na realização dos experimentos: albumina bovina sérica (BSA), salina tamponada com fosfato (PBS, $0,15\text{M}$, $\text{pH } 7,2$), meio de cultura RPMI 1640, soro normal de camundongo (obtido em nosso laboratório). Nos ensaios de histologia foram utilizados Hematoxilina de Mayer (Sigma, USA) e Eosina aquosa (Sigma, USA), bem como álcool etílico absoluto e Xilol (Vetec, BRA).

Para os ensaios de imunohistoquímica visando à detecção de proteínas de matriz extracelular foram utilizados os anticorpos anti-laminina e anti-fibronectina produzidos em coelho (Novotec, Saint Martin-La-Garenne, França), e anticorpo secundário produzido em cabra anti-IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes, USA).

Em todas as análises de citometria de fluxo, seja do infiltrado inflamatório cardíaco, seja dos órgãos linfóides (baço, linfonodos subcutâneos e timo), foram utilizados anticorpos monoclonais produzidos em rato, conjugados e diluídos de acordo com protocolo de nosso laboratório, sendo estes: anti-CD4 PERCP, anti-CD8 APC, anti-TCR PE, anti-CD11b FITC, anti-CD19 PE, anti-CD62L PE, anti-CD44 FITC, anti-CD25 APC, anti-CD49d (VLA-4) FITC, anti-CD49e (VLA-5) PE, anti-CD49f (VLA-6) PE (BD, USA). Para o controle da marcação desses anticorpos foram utilizados os isotipos (IgGs) conjugados com fluorocromos correspondentes (BD, USA).

3.6. Histologia convencional

Para uma análise histológica do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco nas três linhagens de animais infectados e seus respectivos controles (n=3 animais/grupo), foi realizada coloração por hematoxilina e eosina em cortes parafinados. Na desparafinização e hidratação, os cortes foram incubados por 2 vezes durante 10 minutos em xilol e, posteriormente, levados a 3 recipientes diferentes contendo álcool absoluto durante 2 minutos em cada; logo a seguir, os cortes foram deixados em água corrente durante 1 minuto. Durante a coloração, os cortes foram deixados por 10 minutos em hematoxilina, lavados em água corrente por 1 minuto, e incubados em solução de eosina por 3 minutos.

3.7. Imunohistoquímica

Para analisar a expressão de moléculas de matriz extracelular no timo do camundongo das três linhagens controles e infectadas (n = 3 animais/grupo), foi utilizada imunohistoquímica convencional, onde os órgãos foram embebidos em Tissue-

Tek® (LEICA Instruments, AL) e subsequentemente congelados a -70°C . Cortes obtidos em criostato (Leica, AL) de 5 μm de espessura foram assentados em lâminas silanizadas (Easypath), fixados com acetona por 5 minutos, bloqueados com PBS/ BSA 5%. As lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-fibronectina, anti-laminina e seus respectivos isotipos controle (para expressão de ECM no timo) por uma hora, e após, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por 45 minutos com o respectivo anticorpo secundário (anti coelho IgG Alexa 488). As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, Alemanha) e as imagens obtidas foram analisadas e quantificadas através do software de imagem ImageJ®.

3.8. Celularidade e Citometria de Fluxo

A análise de fenótipo nos diferentes órgãos linfóides (timo, baço e linfonodos subcutâneos axiais e braquiais) bem como do infiltrado inflamatório cardíaco, foi realizada por citometria de fluxo onde as células dos camundongos controles e infectados (n=10 animais/grupo, de acordo com cinética de infecção) foram isoladas e ressuspensas em solução de tampão fosfato tamponada (PBS) contendo 5% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab). Em relação aos linfócitos cardíacos, estes foram isolados do órgão através da digestão enzimática com Colagenase D (Roche, USA), onde o órgão é macerado, tratado com a enzima (1mg/ml) em quatro banhos com agitação magnética à 37°C por 20 minutos para separação dos linfócitos. A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer utilizando o corante Trypan Blue (Sigma Co. St. Louis, USA) para exclusão de células mortas. Após a contagem, as células foram distribuídas em uma concentração de 10^6 células vivas/poço em placas de 96 poços com fundo em V (Nunc, USA).

Para a caracterização fenotípica, as células foram incubadas com 10 μl de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos a 4°C por 30 minutos. Como controles negativos de marcação, foram utilizadas IgGs não relacionadas marcadas com os fluorocromos correspondente. Após a marcação, as suspensões celulares foram lavadas em PBS/5% SFB, fixadas em solução contendo formaldeído 1% e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, USA) equipado com o programa CellQuest. Para posterior análise da citometria, foi

utilizado o Software Summit 4.32® (Dako Cytomation). As regiões de análise das populações celulares foram definidas por seu tamanho e granulosidade, onde foi definida uma região para linfócitos e outra para células CD11b+. Os números resultantes de células, bem como o resultado final da citometria foram então inseridos no Software GraphPad Prism4.03 ® com teste estatístico TwoWay ANOVA e Pós Teste Bonferroni.

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do teste “Two-way ANOVA (analysis of variance) e subseqüentemente através do pós-teste de Bonferroni, utilizando-se o Software GraphPad Prism4.03 ®. Os dados foram mostrados como média \pm erro padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p foram menores que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. A superexpressão de PrP^C está associada à diminuição de sobrevivência e aumento da parasitemia dos animais infectados por *T. cruzi*.

Como forma de monitorar o curso da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos que expressam diferentes níveis de PrP^C, realizamos inicialmente experimentos para definir sobrevivência e parasitemia em diferentes dias após a infecção pelo *T. cruzi* (100 parasitas/animal), analisando grupos de animais não isolados (5 por gaiola) e isolados entre si.

O grupo de animais TG20 isolado e não isolado, apresentou taxa média de sobrevivência muito abaixo dos outros grupos na fase aguda da infecção (Figura 4.1).

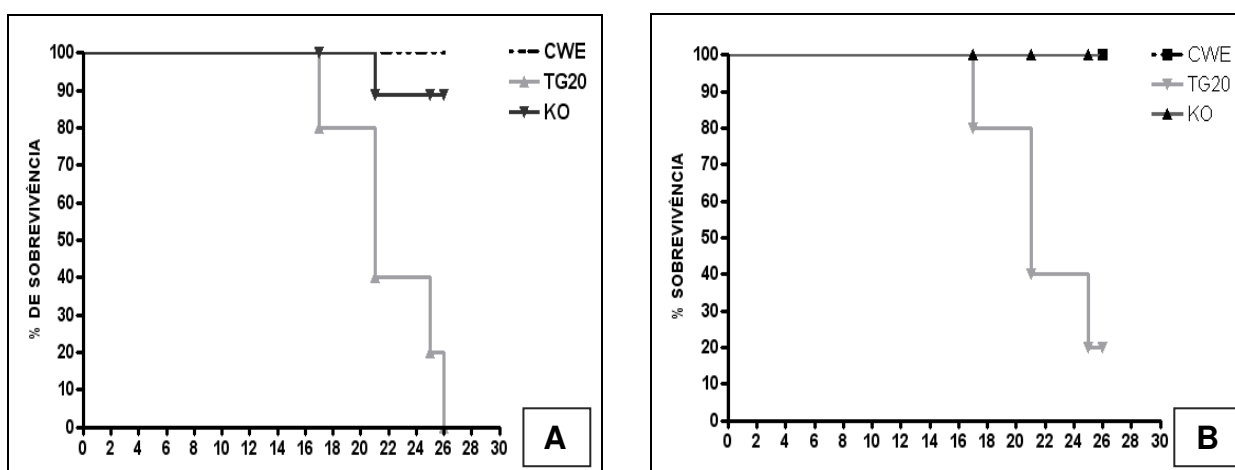


Figura 4.1. Queda na sobrevivência de animais transgênicos para PrP^C, após infecção aguda pelo *T. cruzi*. A sobrevivência dos indivíduos de cada grupo foi avaliada durante infecção aguda a cada dois dias. N = 20 animais/grupo em 5 animais/gaiola (A) ou 1 animal/gaiola (B).

Alguns indivíduos do grupo KO não isolados, não sobreviveram durante a avaliação devido a problemas comportamentais agressivos, os quais podem estar relacionados à perda de memória recente em animais dessa linhagem (Criado et al, 2005); cabe ressaltar que esse indivíduos não morreram devido à infecção, já que foram encontrados com ferimentos graves no corpo.

Nesses mesmos grupos de animais, a parasitemia foi mais alta nos animais TG20, no pico da infecção, quando comparada aos animais CWE ou com os nocautes de PrP^C (Figura 4.2). No entanto, observou-se queda da parasitemia na fase tardia, nos

diferentes grupos, incluindo naqueles indivíduos do grupo TG20, que sobreviveram à fase aguda da infecção.

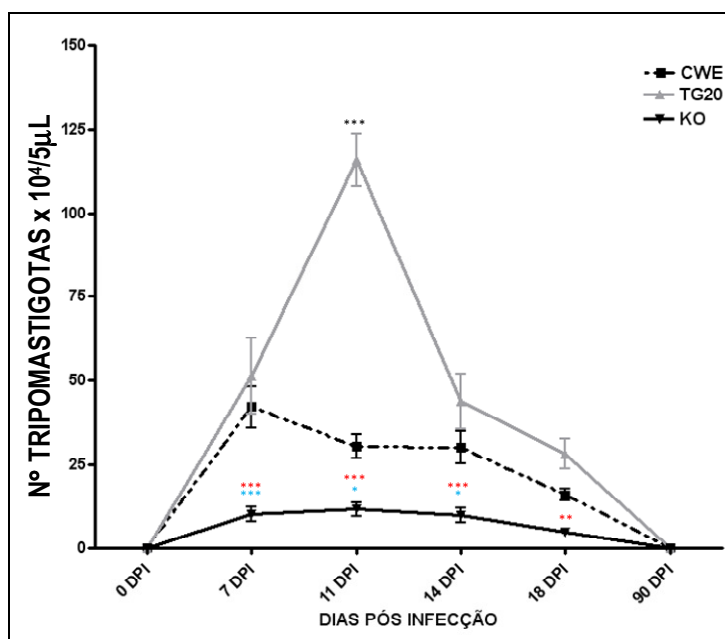


Figura 4.2 Aumento de parasitemia em camundongos transgênicos para PrP^C, submetidos à infecção experimental. Animais com diferentes níveis de expressão de PrP^C foram inoculados com 100 parasitas da cepa Y de *T. cruzi*, e a carga parasitária avaliada de acordo com cinética de infecção em contagem direta por microscopia ótica de luz. Valores expressos em média + erro padrão, havendo 10 animais por grupo. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

Tomados em conjunto, os dados acima mostram que a superexpressão de PrPC está associada a uma perda de resistência à infecção pelo *T. cruzi*.

4.2. Aumento do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de animais transgênicos para PrP^C, e submetidos à infecção experimental pelo *T. cruzi*.

A infecção experimental aguda e tardia em camundongos é caracterizada por uma intensa infiltração de linfócitos no tecido cardíaco. Para avaliar a intensidade deste infiltrado e o fenótipo de seus tipos celulares principais (linfócitos T e macrófagos) foi realizada uma análise histológica do tecido cardíaco nos animais com diferentes níveis de PrP^C. Histologicamente não observamos variações significativas na presença de infiltração leucocitária entre os três grupos de animais, nem na fase aguda, nem na fase tardia da infecção (Figura 4.3). De fato, nos três grupos, o infiltrado mais abundante ocorreu no dia 18 pós-infecção. No entanto, análise citofluorimétrica demonstrou que no

grupo TG20 há um aumento da população total de linfócitos no infiltrado cardíaco se comparado aos outros grupos na fase aguda da infecção (Figura 4.4), bem como aumento nos valores absolutos das subpopulações linfocitárias T e B no local, e ainda maior número de células expressando CD11b.

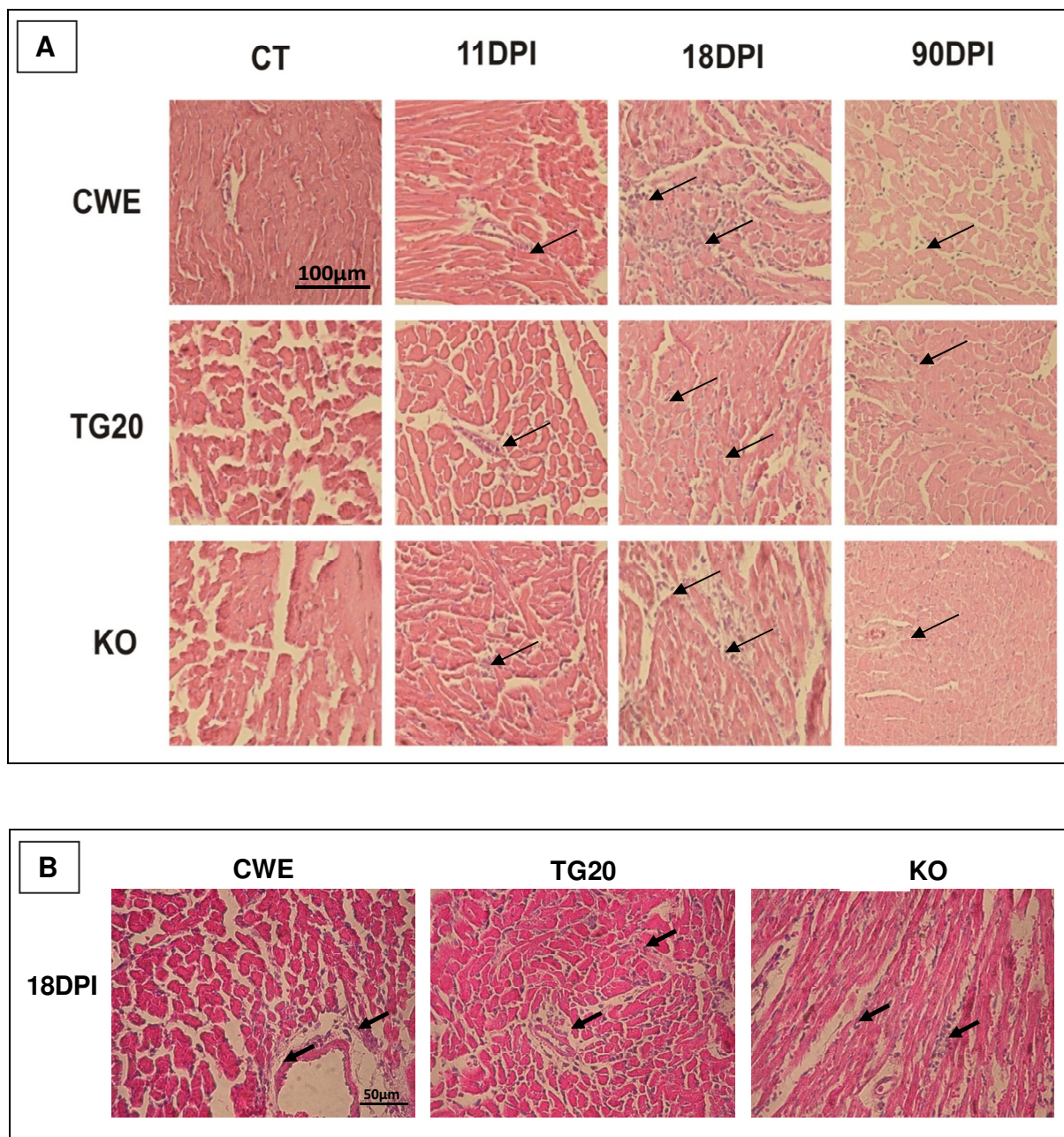


Figura 4.3. Análise histológica do infiltrado inflamatório em tecido cardíaco durante a infecção, em animais com diferentes níveis de PrP^C. (A) As imagens demonstram que não há diferença significativa da presença de células inflamatórias entre os grupos durante toda cinética de infecção. (B) Imagens representativas dos mesmos grupos em um ponto da fase aguda de infecção. Setas pretas indicam as células observadas. DPI = Dias Pós Infecção, CT = Animais não infectados em 0DPI. Imagens representativas de um animal por grupo. Aumento de 20x (A) e 40x (B). Coloração: Hematoxilina-Eosina.

Considerando o papel haptotático de moléculas de matriz extracelular na gênese do infiltrado inflamatório, inclusive na cardite chagásica (Silva-Barbosa et al, 1997), procuramos também avaliar se havia padrões distintos de distribuição e deposição de laminina e fibronectina no tecido cardíaco dos diferentes grupos de animais. Confirmando nossos dados anteriores (Silva-Barbosa et al, 1997)), vimos um aumento na deposição de laminina e fibronectina no tecido cardíaco no curso da infecção. No entanto, tal aumento foi semelhante nos três grupos analisados, apesar de termo notado uma tendência à maior deposição de laminina nos animais TG20 (Figuras 4.5 e 4.6).

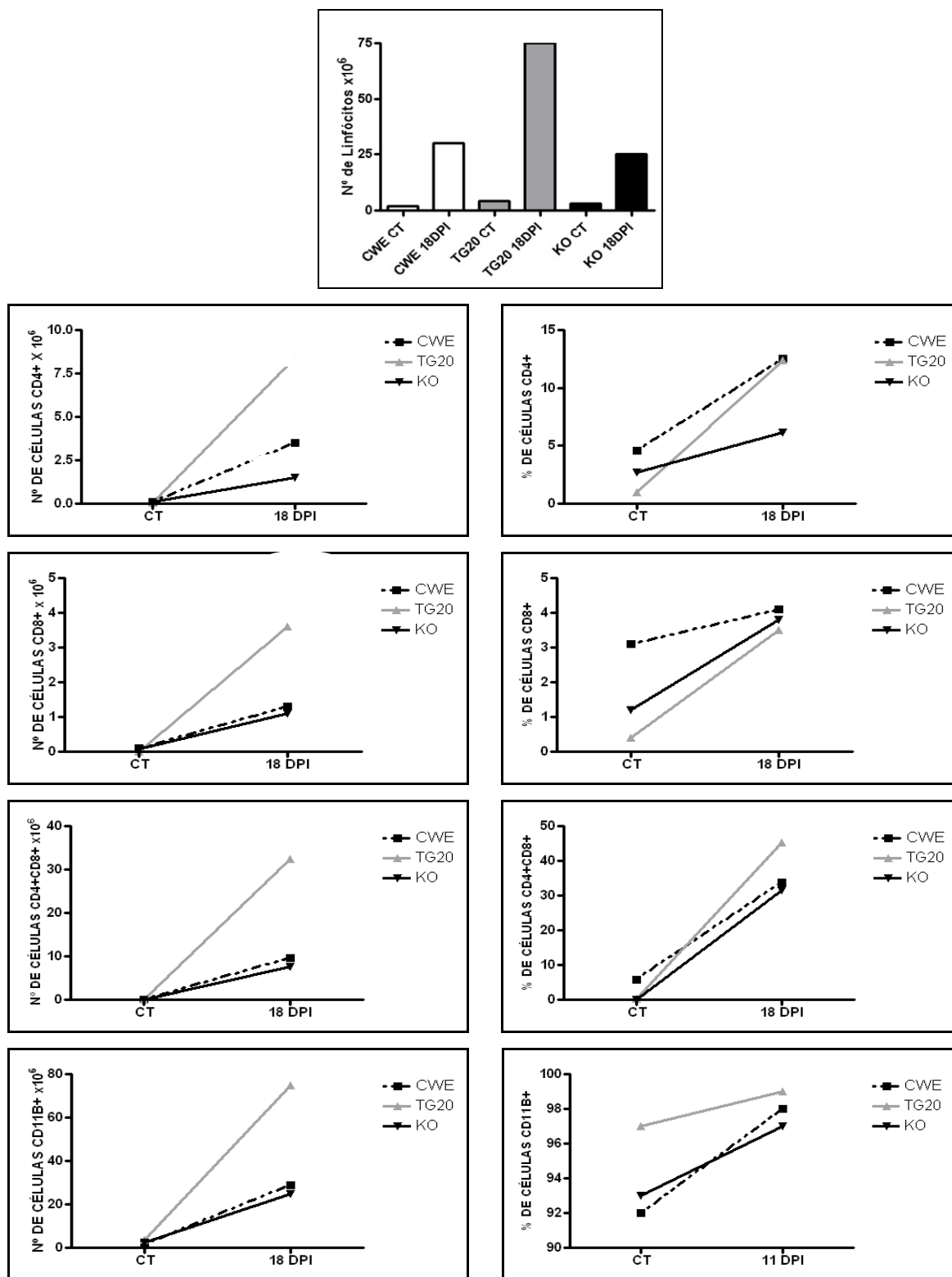


Figura 4.4. Aumento de leucócitos presentes no tecido cardíaco de camundongos transgênicos para PrP^C, após infecção experimental pelo *T. cruzi*. Linfócitos totais bem como suas subpopulações e células CD11b+ foram avaliados por citofluorimetria em um ponto da fase aguda da infecção comparado aos grupos não-infectados. Os linfócitos foram analisados no gate de linfócitos e os macrófagos, no gate correspondente. Dados representativos de uma amostra / grupo contendo células de 5 animais/grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. Valores expressos em números absolutos e porcentagens.

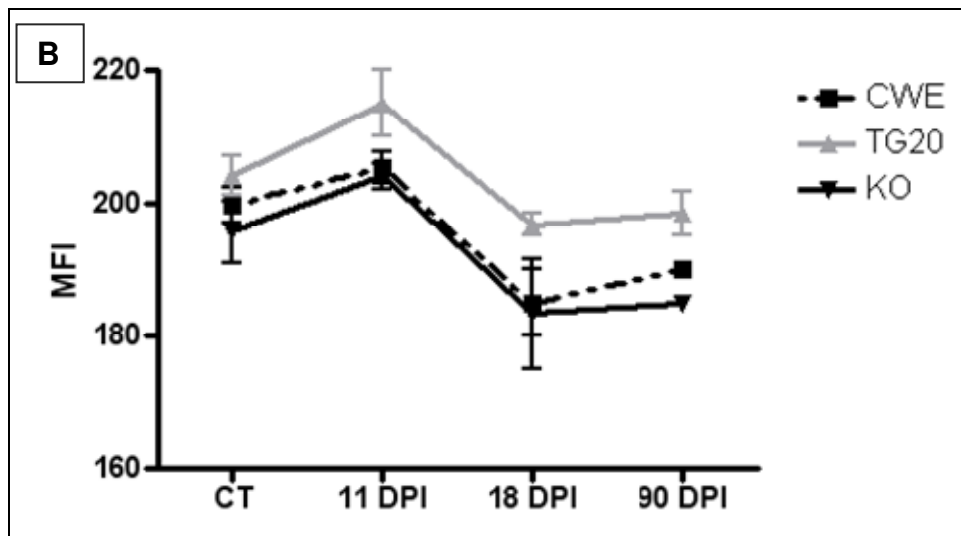
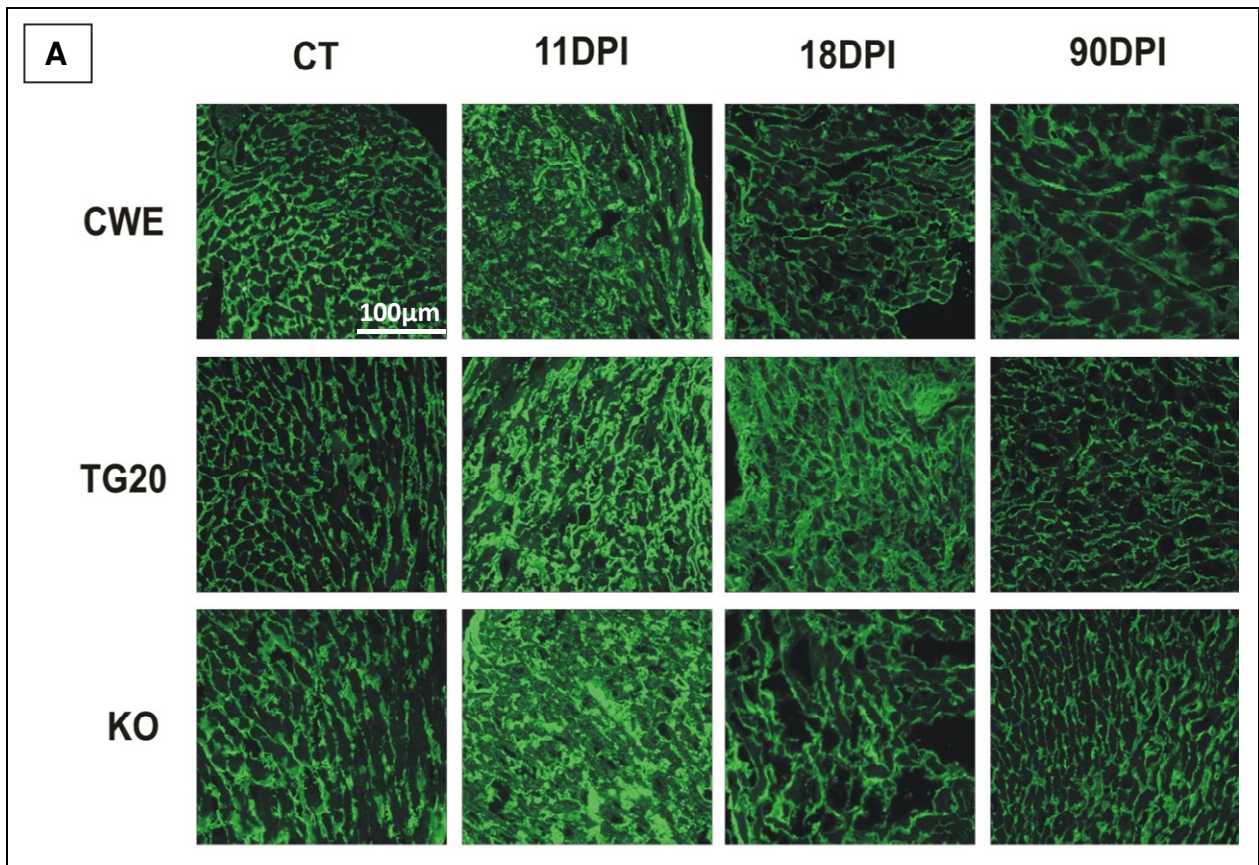


Figura 4.5. Deposição de laminina em tecido cardíaco de animais submetidos à infecção aguda e tardia pelo *T. cruzi*. (A) Análise por imunohistoquímica da expressão de laminina no coração em animais com diferentes níveis de PrPc. Imagens representativas de um animal por grupo. Aumento de 20x. (B) Média de intensidade de fluorescência (MFI) a partir da análise morfométrica das imagens obtidas de 3 animais por grupo. MFI por área de imagem. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI.

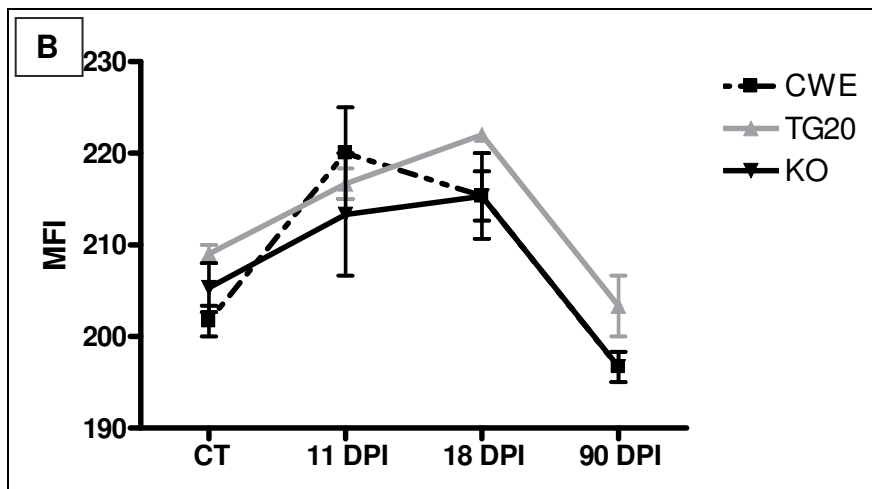
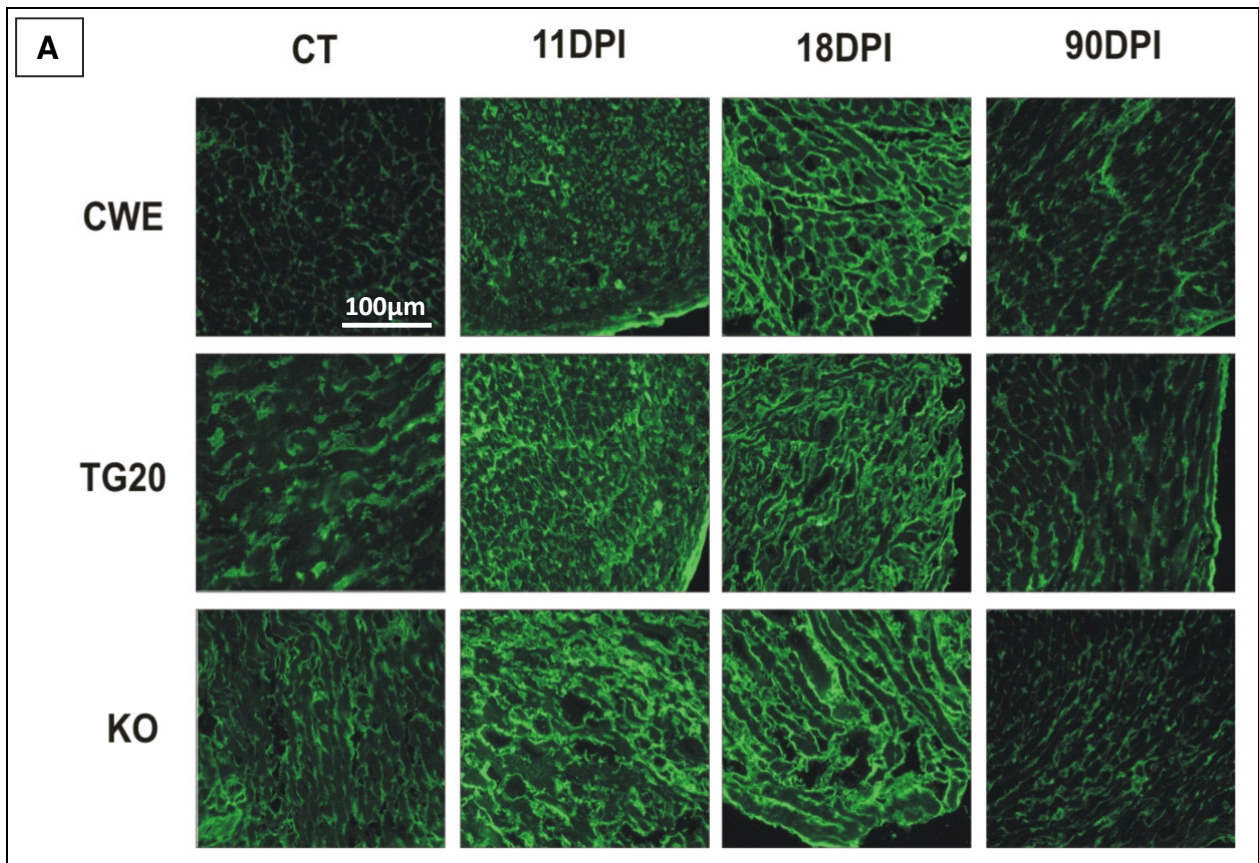


Figura 4.6. Deposição de fibronectina em tecido cardíaco de animais submetidos à infecção aguda e tardia pelo *T. cruzi*. (A) Análise por imunohistoquímica da expressão de fibronectina no coração em animais com diferentes níveis de PrPc. Imagens representativas de um animal por grupo. Aumento de 20X. (B) Média de intensidade de fluorescência (MFI) a partir da análise morfométrica das imagens obtidas de 3 animais por grupo. MFI por área de imagem. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI.

4.3. Impacto da proteína PrP^C na celularidade e fenótipo de linfócitos de órgãos linfóides periféricos (baço e linfonodos subcutâneos) após infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Considerando os dados relatados acima, procuramos analisar se haveria uma expansão de linfócitos e células com fenótipo CD11b nos órgãos linfóides periféricos dos animais TG20 infectados, a qual poderia estar correlacionada com o aumento de infiltrado visto no tecido cardíaco desses animais. No entanto, no curso da infecção aguda, e em termos de números absolutos de cada subpopulação de linfócitos T esplênicos, definidos pela expressão de CD4 e CD8, os animais TG20 mantiveram valores inferiores quando comparados aos controles tipo selvagem, ou mesmo aos camundongos KO (Figura 4.7). Conforme visto na mesma figura, este padrão, no entanto, não foi observado para linfócitos B ou células CD11b+.

Números inferiores de linfócitos T CD4+ também foram vistos nos baços de camundongos TG20 submetidos a uma infecção tardia, quando comparados ao grupo CWE ou aos animais KO, tal não ocorrendo também em termos de células B e macrófagos.

Nos linfonodos subcutâneos, a falta de expansão de células T ao longo da infecção foi muito mais nítida que no baço, abrangendo células T CD4+, CD8+ e CD4+CD8+. É interessante notar que, se por um lado, a expansão de células B foi observada em níveis semelhantes àquela vista nos animais selvagens CWE, não vimos aumento no número de células CD11b+, diferindo portanto dos animais selvagens. Cabe ainda notar que não houve diferenças significativas entre os animais CWE e KO, em termos de números absolutos de populações linfocitárias e de células CD11b+. O conjunto destes dados está resumido na figura 4.8.

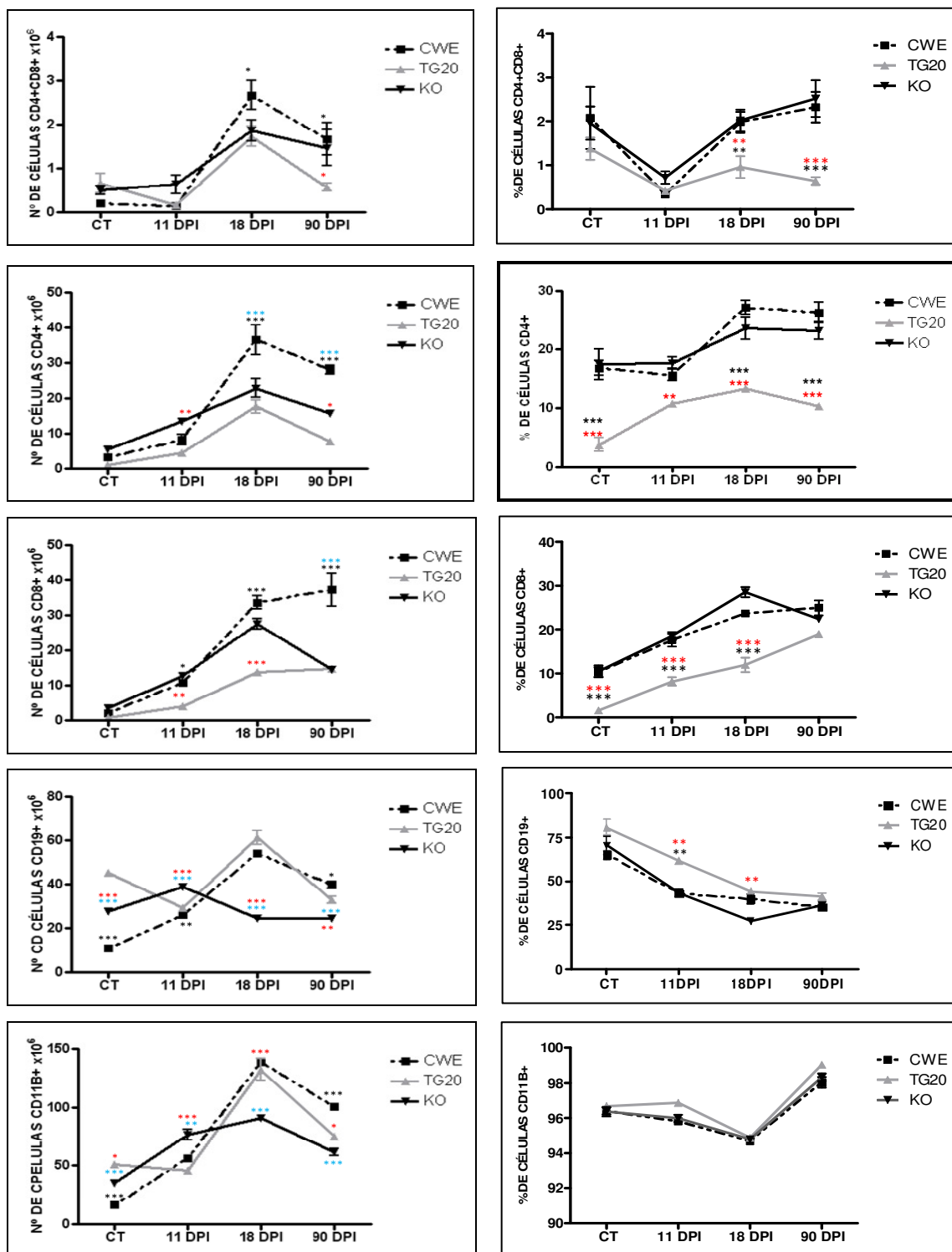


Figura 4.7. Subpopulações linfocitárias e células CD11b+ no baço de animais com diferentes níveis de PrP^C, após infecção pelo *T. cruzi*. Análise de linfócitos de acordo com fenótipos CD4+CD8+, CD4+ e CD8+ e CD19+ através de citometria de fluxo durante a cinética de infecção, incluindo as fases aguda e crônica. Valores expressos em números absolutos e porcentagens com médias + erro padrão, havendo 5 animais por grupo. DPI = Dias Pos Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

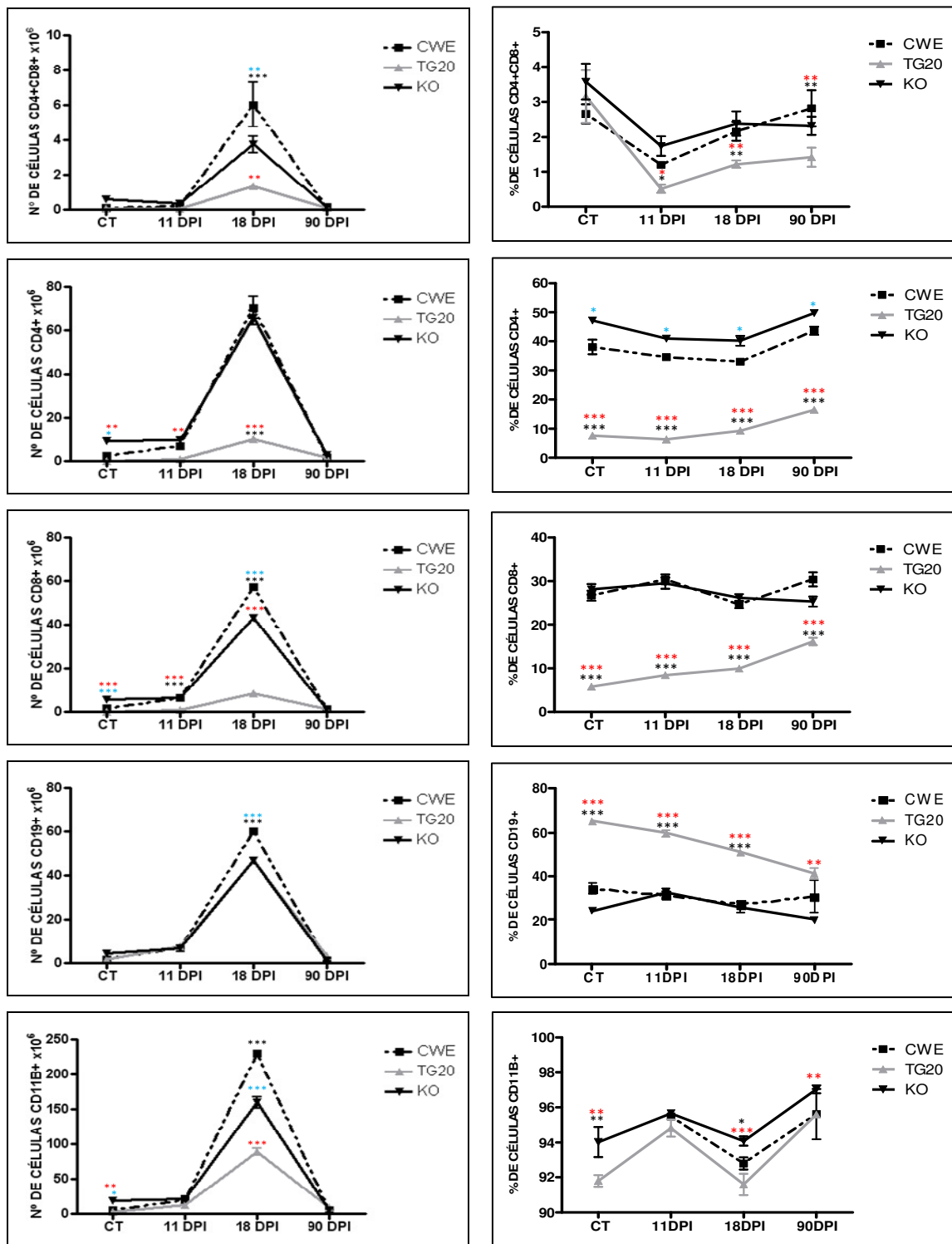


Figura 4.8. Subpopulações linfocitárias e células mielóides CD11b⁺ nos linfonodos subcutâneos de animais com diferentes níveis de PrP^C, após infecção pelo *T. cruzi*. Análise de linfócitos de acordo com fenótipos CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ e CD8⁺ e CD19⁺ através de citometria de fluxo durante a cinética de infecção, incluindo as fases aguda e crônica da infecção. Valores expressos em números absolutos e porcentagens com médias + erro padrão, havendo 5 animais por grupo. DPI = Dias Pos Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

Após observação dessas supopulações linfocitárias, decidimos analisar nessas mesmas células a expressão de moléculas relacionadas à ativação de linfócitos T, tais como CD62L, CD44, e CD25. Vimos que todos os grupos apresentam aumento no número absoluto de células CD4+, CD8+ e CD4+CD8+ de fenótipo CD62L^{LOW}, tanto no baço quanto nos linfonodos subcutâneos (Figura 4.9).

Também em relação às células expressando alta densidade da molécula CD44 (Figura 4.10), vimos que todos os grupos apresentam aumento no número absoluto de células de fenótipo CD4+CD44^{HIGH}, CD8+CD44^{HIGH} e CD4+CD8+CD44^{HIGH}, tanto no baço quanto nos linfonodos subcutâneos. Aumento semelhante foi ainda observado em relação às subpopulações de linfócitos T expressando CD25^{LOW} (Figura 4.11).

Fizemos ainda análises de células expressando alta densidade de CD25, visto que, esta subpopulação pode representar grande parte das células reguladoras, que também expressam a molécula FoxP3. Vimos também aumento desta subpopulação nos três grupos de camundongos infectados (Figura 4.12).

Tomados em conjunto, os resultados descritos acima, mostram que nos camundongos TG20 infectados pelo *T. cruzi* houve expansão nas subpopulações de linfócitos T, no baço e nos linfonodos subcutâneos. No entanto, principalmente nos linfonodos, tal expansão foi proporcionalmente bem menor que aquela observada nos animais CWE e KO. Por outro lado, as análises citofluorimétricas para detecção de CD62L, CD44 e CD25 sugerem que ocorra ativação nos linfócitos T, não apenas nos animais CWE e KO, mas também nos TG20, e ainda aumento de células T reguladoras.

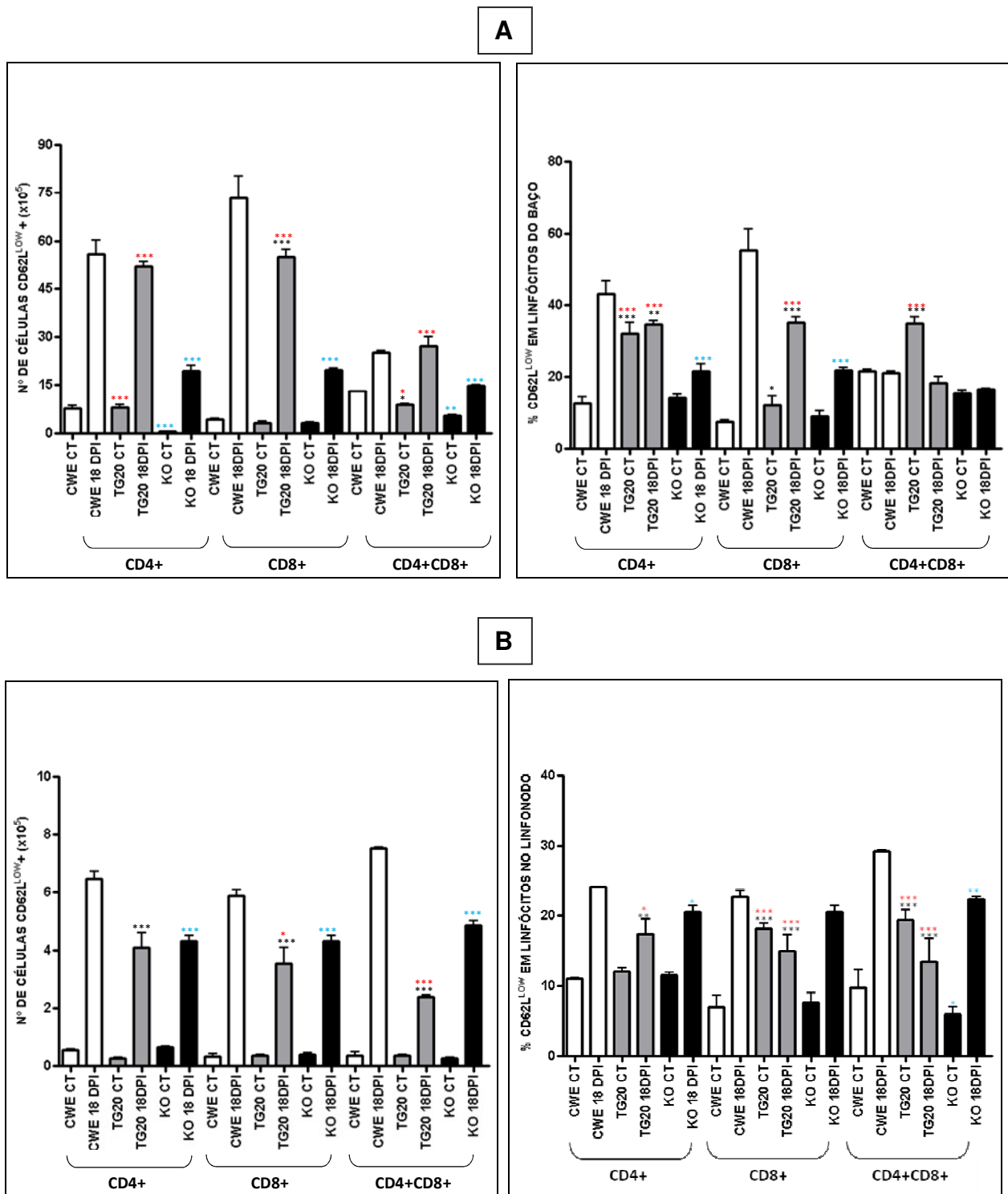


Figura 4.9. Análise de células CD62L^{LOW} nas subpopulações de linfócitos T no baço (A) e linfonodos subcutâneos (B), na fase aguda da infecção. Linfócitos T de animais com diferentes níveis de PrP^C foram analisados por citometria de fluxo para detecção de células CD62L^{LOW} nas subpopulações de células T definidas por CD4 e CD8. Mostramos aumento de células expressando baixa densidade de CD62L em um ponto da fase aguda da infecção (18DPI). Valores expressos em números absolutos e porcentagens com médias + erro padrão, havendo 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI.* p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

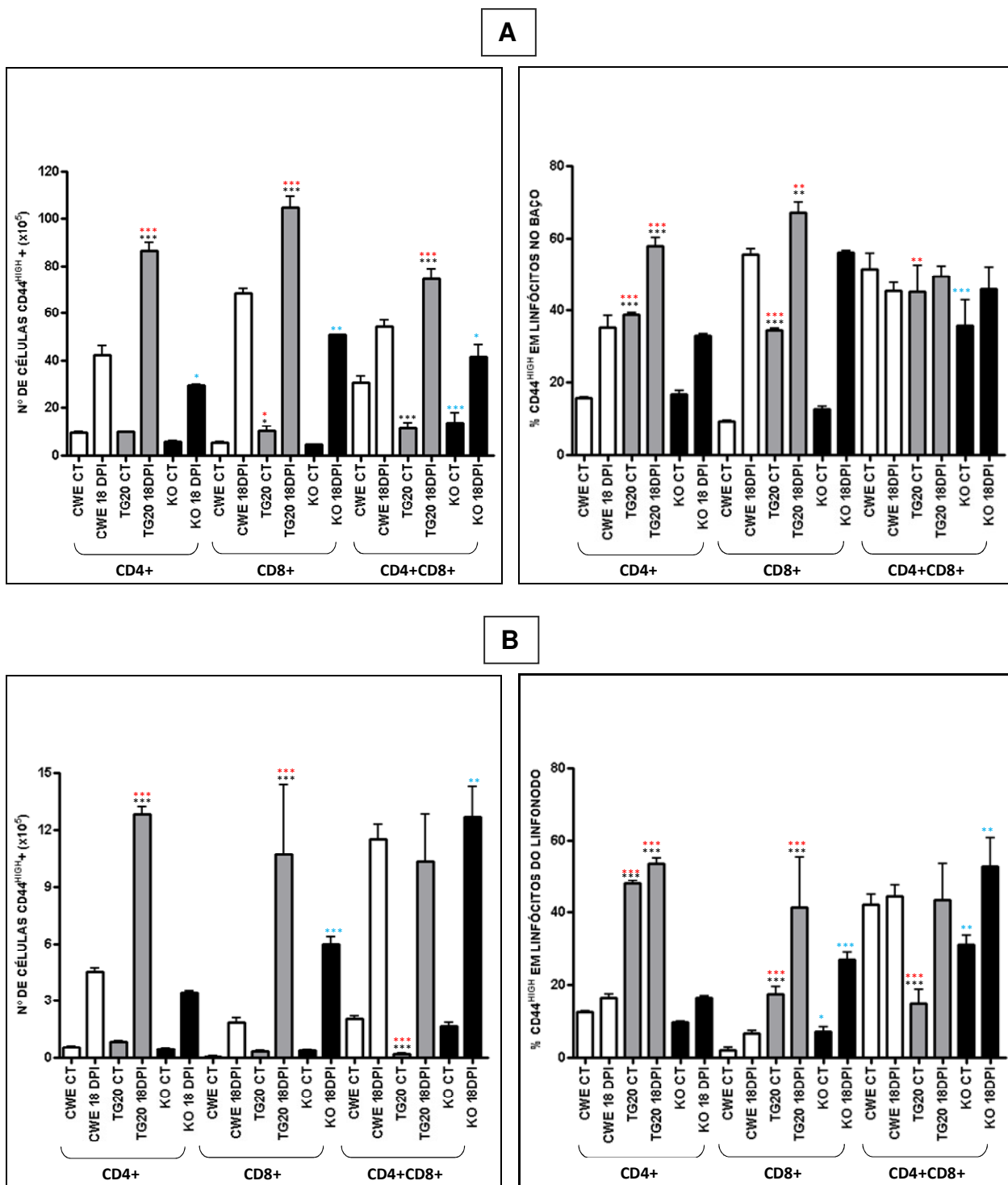


Figura 4.10. Análise de células CD44^{HIGH} nas subpopulações de linfócitos T no baço (A) e linfonodos subcutâneos (B), na fase aguda da infecção. Linfócitos T de animais com diferentes níveis de PrP^C foram analisados por citometria de fluxo para detecção de células CD44^{HIGH} nas subpopulações de células T definidas por CD4 e CD8. Mostramos aumento de células expressando alta densidade de CD44 em um ponto da fase aguda da infecção (18 DPI). Valores expressos em números absolutos e porcentagens com médias + erro padrão, havendo 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

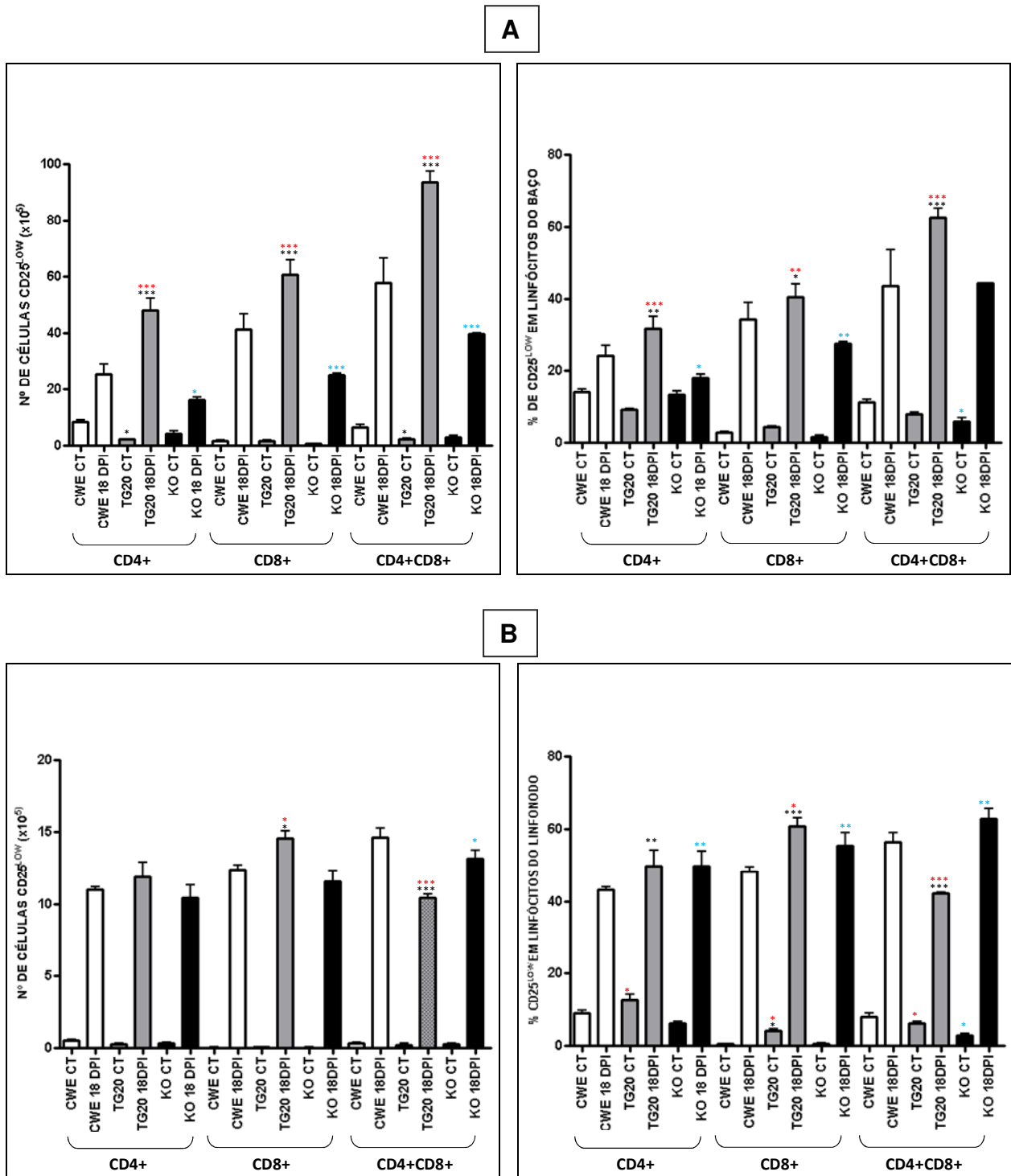


Figura 4.11. Análise de células CD25^{LOW} nas subpopulações de linfócitos T no baço (A) e linfonodos subcutâneos (B), na fase aguda da infecção. Linfócitos T de animais com diferentes níveis de PrP^C foram analisados por citometria de fluxo para detecção de células CD25^{LOW} nas subpopulações de células T definidas por CD4 e CD8. Mostramos aumento de células expressando baixa densidade de CD25 em um ponto da fase aguda da infecção (18DPI). Valores expressos em números absolutos e porcentagens com médias + erro padrão, havendo 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

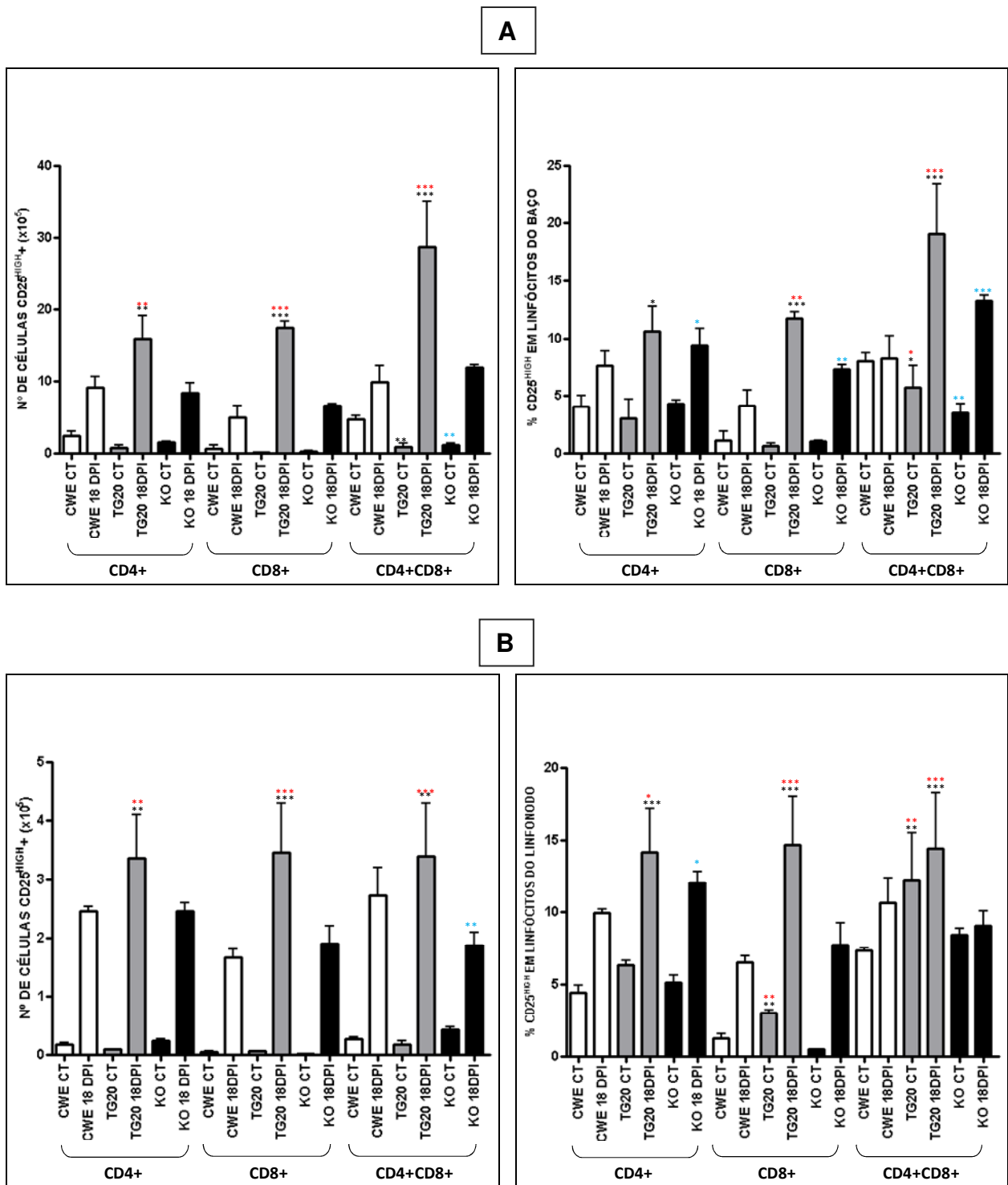


Figura 4.12. Análise de células CD25^{HIGH} nas subpopulações de linfócitos T no baço (A) e linfonodos subcutâneos (B), na fase aguda da infecção. Linfócitos T de animais com diferentes níveis de PrP^C foram analisados por citometria de fluxo para detecção de células CD25^{HIGH} nas subpopulações de células T definidas por CD4 e CD8. Mostramos aumento de células expressando alta densidade de CD25 em um ponto da fase aguda da infecção (18DPI). Valores expressos em números absolutos e porcentagens com médias + erro padrão, havendo 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

4.4. Atrofia tímica durante infecção pelo *T. cruzi* nos animais com diferentes níveis de expressão de PrP^C:

Dados prévios de nosso laboratório demonstraram que durante a infecção experimental ocorre severa atrofia tímica, com morte maciça, e ainda escape anormal de linfócitos T CD4+CD8+ (revisado em Savino, 2006; Savino et al, 2007). Para avaliar o impacto da proteína PrP^C sobre a atrofia do timo na infecção pelo *T. cruzi*, analisamos inicialmente a massa relativa bem como a celularidade deste órgão (Figura 4.13) no curso da infecção, em animais com diferentes níveis da proteína. Durante a fase aguda da infecção, vimos que ocorre atrofia em todos os grupos estudados, apesar da queda na massa relativa e número de timócitos totais ser mais acentuada nos animais CWE e KO. Por outro lado, durante a fase mais tardia, houve recuperação da atrofia nestes dois grupos de animais, mas não nos camundongos TG20.

Analisamos ainda o fenótipo destes timócitos, em termos das subpopulações definidas pela expressão de CD4 e CD8. Conforme já observado em outras linhagens de camundongos (Leite-de-Moraes et al, 1991; Cotta-de-Almeida et al, 2003), vimos uma depleção de células duplo-positivas CD4+CD8+ durante a fase aguda da infecção nos grupos de animais CWE e KO; depleção esta que foi substancialmente recuperada aos 90 dias de infecção, tanto em números absolutos quanto em valores percentuais (Figura 4.14), correlacionando portanto com os dados de massa relativa e celularidade total do órgão.

O grupo TG20, que já possui número de timócitos duplo-positivos reduzido em relação aos outros grupos (Terra-Granado et al, 2007), teve também queda acentuada dessa subpopulação, sem no entanto apresentar recuperação na fase tardia da infecção.

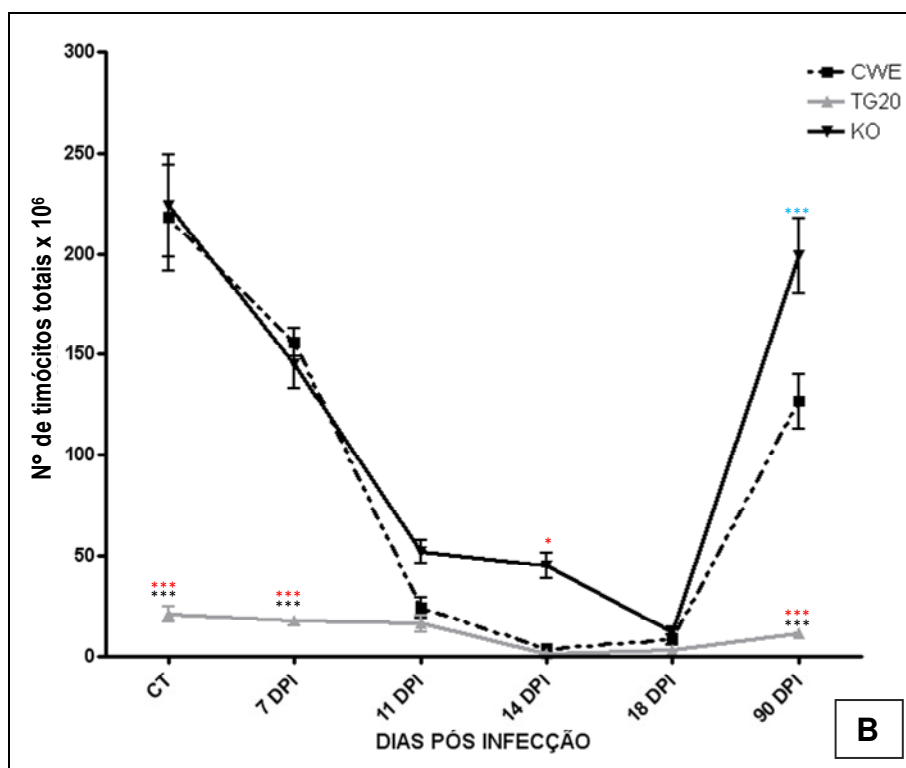
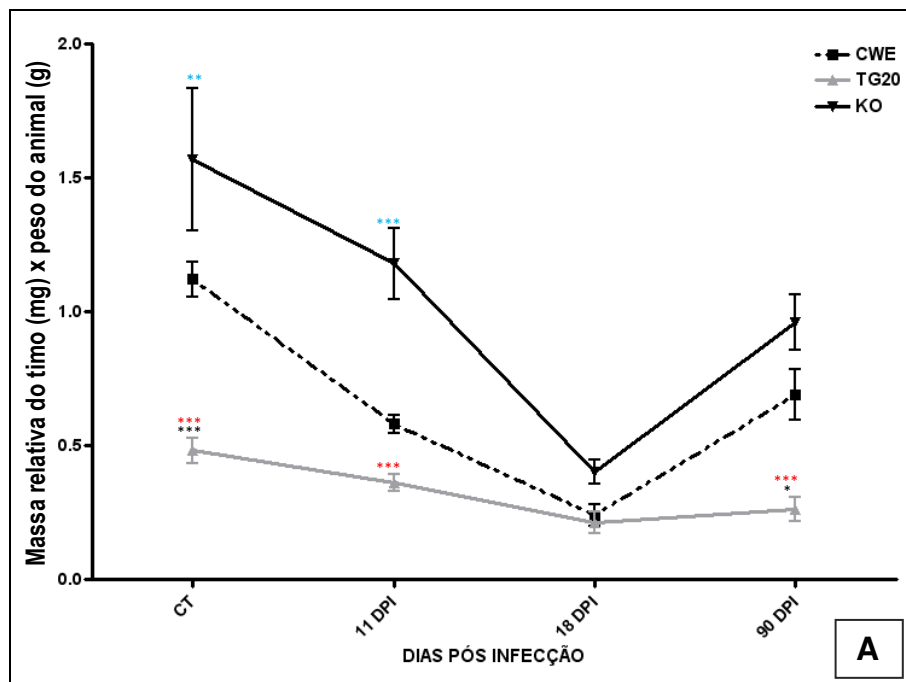


Figura 4.13. Massa relativa e celularidade do timo, em animais com diferentes níveis de PrP^C infectados ou não pelo *T. cruzi*. Análise de massa relativa (mg de massa de timo/g de massa corporal do animal) demonstra atrofia tímica (A), bem como queda da celularidade total do órgão (B) durante fase aguda da infecção. Valores expressos em números absolutos e médias + erro-padrão, havendo 10 animais por grupo. CT = animais não infectados em 0 DPI * p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20 , KO vs TG20 e CWE vs KO.

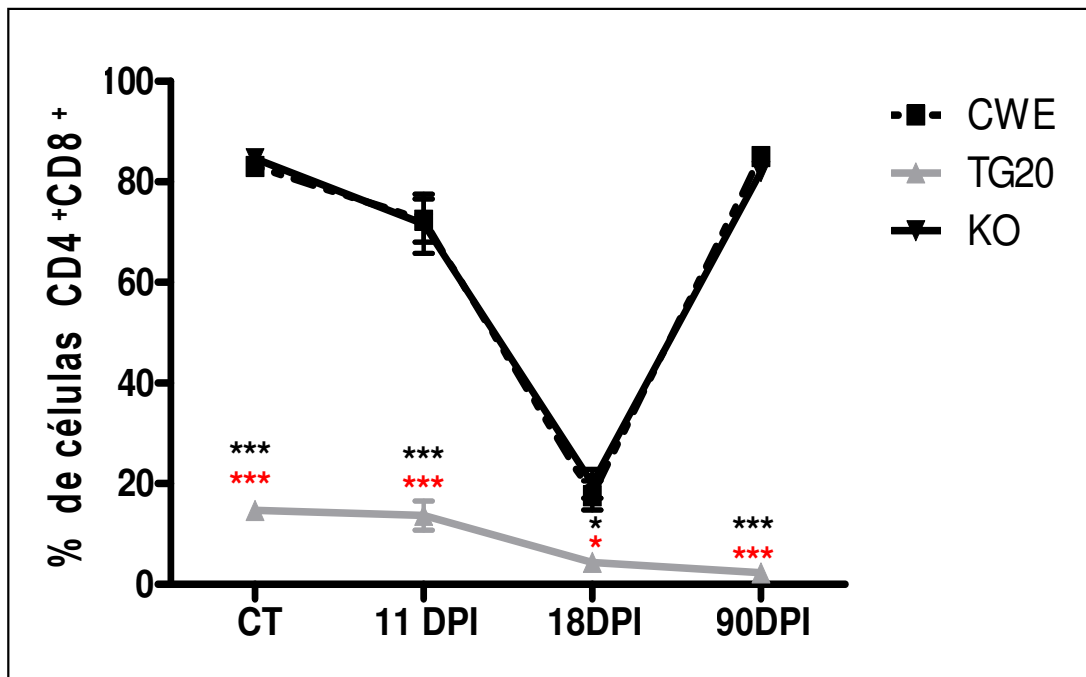
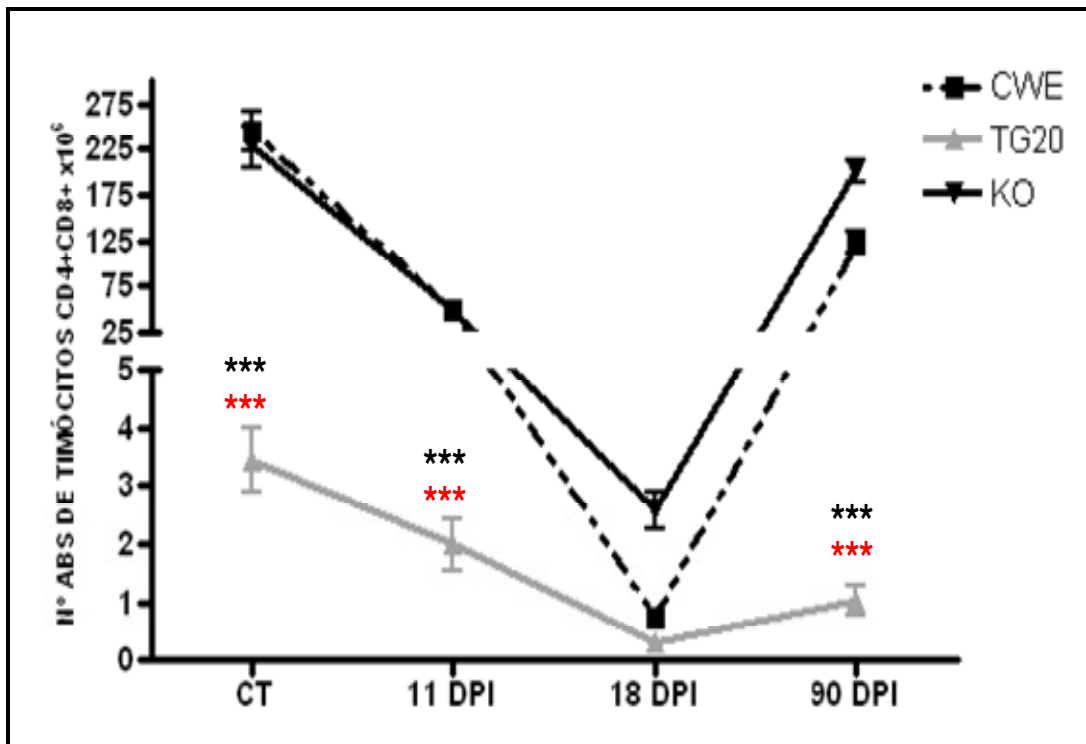


Figura 4.14: Análise de células duplo positivas CD4+CD8+ durante cinética de infecção pelo *T. cruzi*. O gráfico demonstra depleção maciça de subpopulações duplo positivas no timo. Animais com diferentes níveis de PrP^C infectados ou não pelo *T. cruzi* foram analisados de acordo com seu fenótipo de células duplo-positivas no timo em cinética de infecção por citometria de fluxo utilizando-se marcadores específicos para CD4 e CD8. DPI = Dias Pós Infecção. Valores expressos em números absolutos e porcentagens, com média + erro padrão, havendo 10 animais por grupo. CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

Em relação às outras subpopulações de timócitos, a manutenção da baixa frequência de células simples positivas para CD4 ou CD8 foi observada no grupo TG20 durante cinética de infecção (Figura 4.15). O grupo KO apresentou queda de células simples positivas na fase aguda da infecção, porém quando comparado ao grupo CWE, mostrou recuperação dessas mesmas populações na fase tardia. Já os animais TG20 não mostraram qualquer recuperação no número destas subpopulações de timócitos maduros.

Na figura 4.16, apresentamos um parâmetro geral em perfis citofluorimétricos demonstrando as variações das populações de timócitos em um ponto da fase aguda e na fase tardia, comparadas aos controles sem infecção.

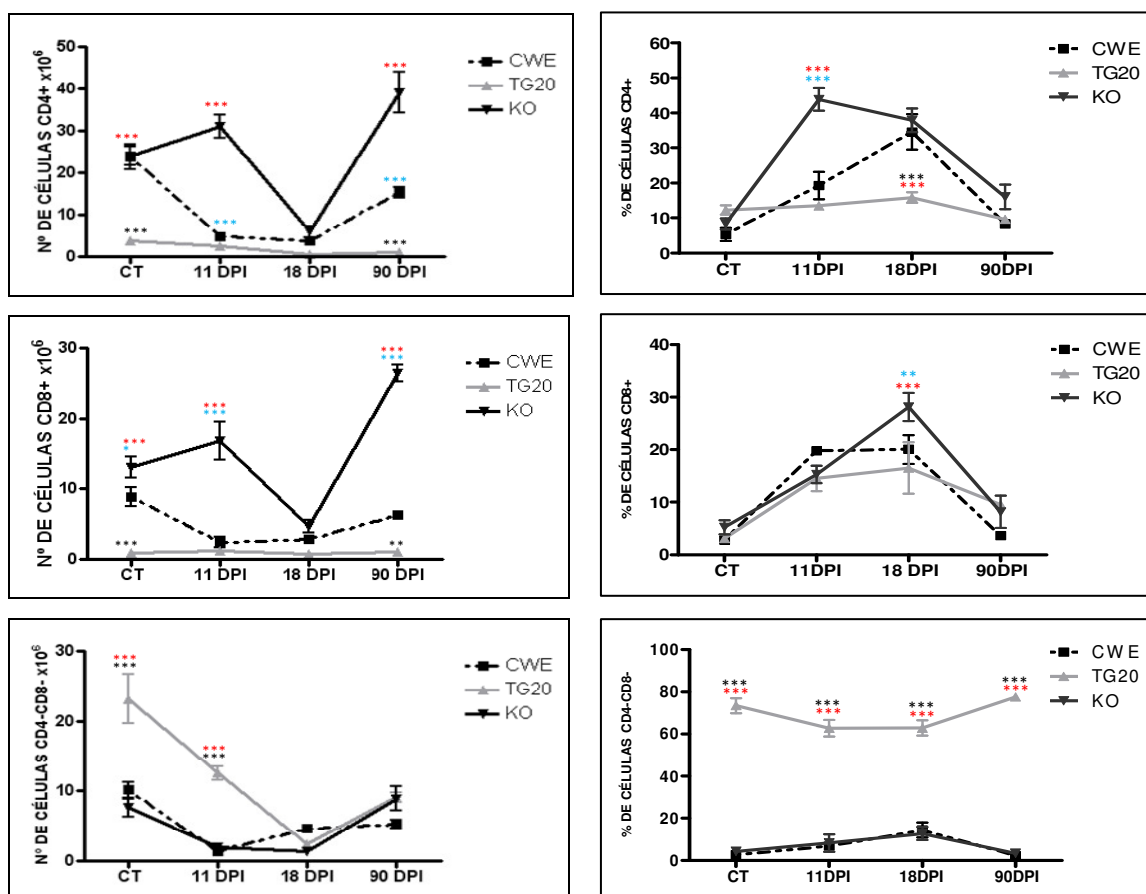


Figura 4.15. Análise das subpopulações celulares intratímicas durante cinética de infecção. Animais com diferentes níveis de PrP^C infectados e não infectados pelo *T.cruzi* foram analisados de acordo com seu fenótipo de células CD4+, CD8+, e CD4-CD8- no timo em cinética de infecção por citometria de fluxo utilizando-se marcadores específicos para CD4 e CD8. Valores expressos em números absolutos e porcentagens, e médias +/- erro padrão havendo 10 animais por grupo. DPI = Dias Pos Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

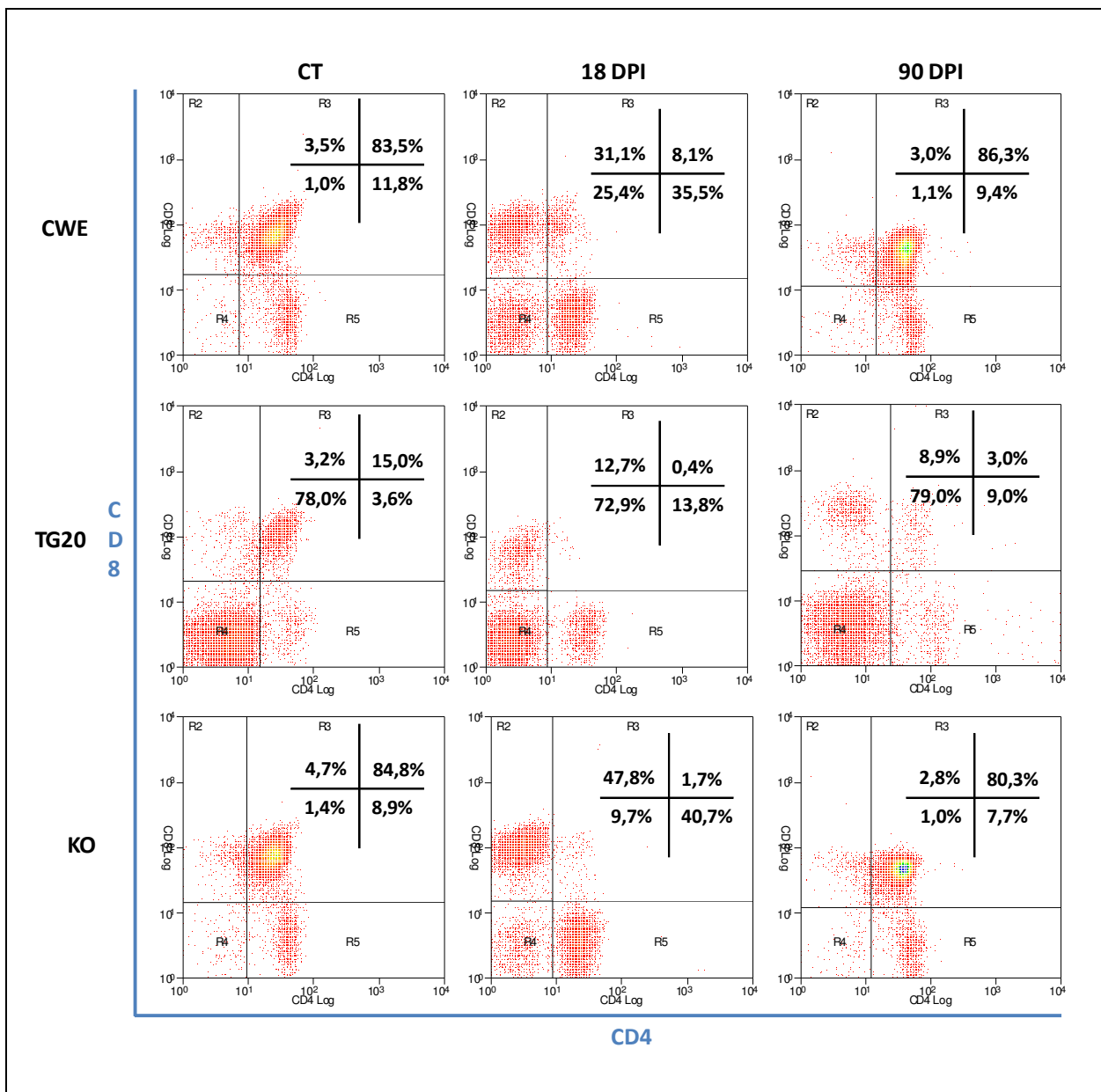


Figura 4.16. Perfis citofluorimétricos de subpopulações timocitárias durante fase aguda e tardia em animais com diferentes níveis de PrP^c. As imagens demonstram a intensa depleção de timócitos duplo positivos durante a infecção aguda. Dot Plots representativos em cada grupo de animais. DPI = Dias Pós Infecção; CT = Animais não infectados em 0 DPI.

4.5. Expressão de moléculas de matriz extracelular no timo e análise de seus receptores em timócitos de camundongos expressando diferentes níveis de PrP^C, após infecção experimental pelo *T cruzi*.

Dados prévios de nosso laboratório demonstraram que durante a fase aguda da infecção experimental em murinos há um aumento expressivo de deposição de moléculas de matriz extracelular no timo, tais como laminina e fibronectina, e que esse evento poderia estar relacionado ao escape de células imaturas deste órgão para periferia ou outros órgãos alvo da infecção, como o coração (revisado em Savino, 2006; Savino et al, 2007).

Analisamos então a deposição dessas moléculas no timo, seguindo cinética de infecção nos três grupos de camundongos. Os resultados demonstram que o pico de deposição de laminina e fibronectina ocorria no dia 11 pós-infecção, portanto precedendo o pico de parasitemia. Por outro lado, os valores de intensidade de fluorescência voltavam a níveis mais baixos (ainda que superiores aos animais não-infectados) na fase tardia (Figuras 4.17 e 4.18). Cumpre salientar que os níveis de deposição destas moléculas é mais alto nos camundongos TG20, não apenas antes da infecção mas também durante a infecção, nas fases aguda e tardia (à exceção de fibronectina).

Em relação à alta densidade de expressão de receptores fibronectina (VLA-4 e VLA-5) e de laminina (VLA-6) mostrados nas figuras 4.19, 4.20 e 4.21, observamos que na subpopulação de timócitos CD4+CD8+ houve aumento no número relativo de células VLA-4^{HIGH}, VLA-5^{HIGH} e VLA-6^{HIGH}. Ainda que visto nos três grupos de animais, este aumento foi particularmente marcante nos animais TG20. Estes dados também vão no sentido de que interações mediadas por ligantes e receptores de matriz extracelular poderiam estar favorecendo, particularmente nos animais TG20, a exportação anormal de timócitos imaturos para a periferia do sistema do sistema imune.

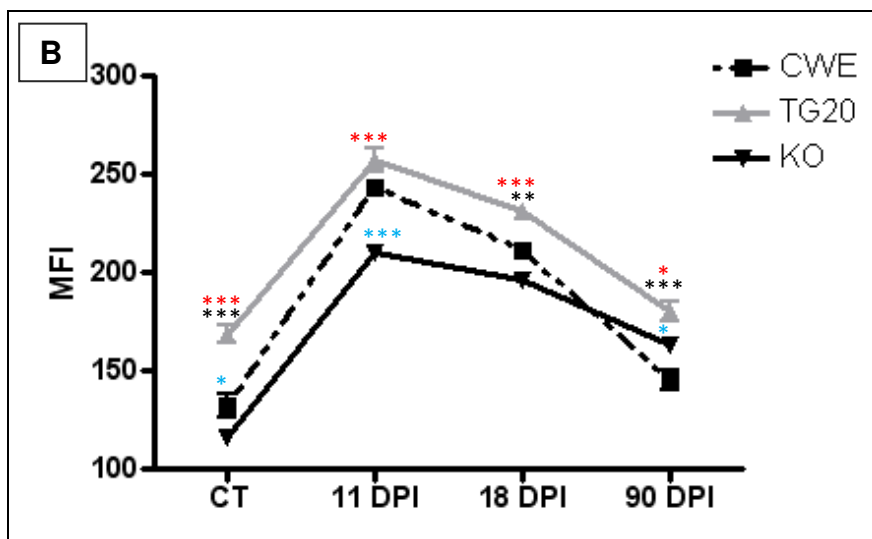
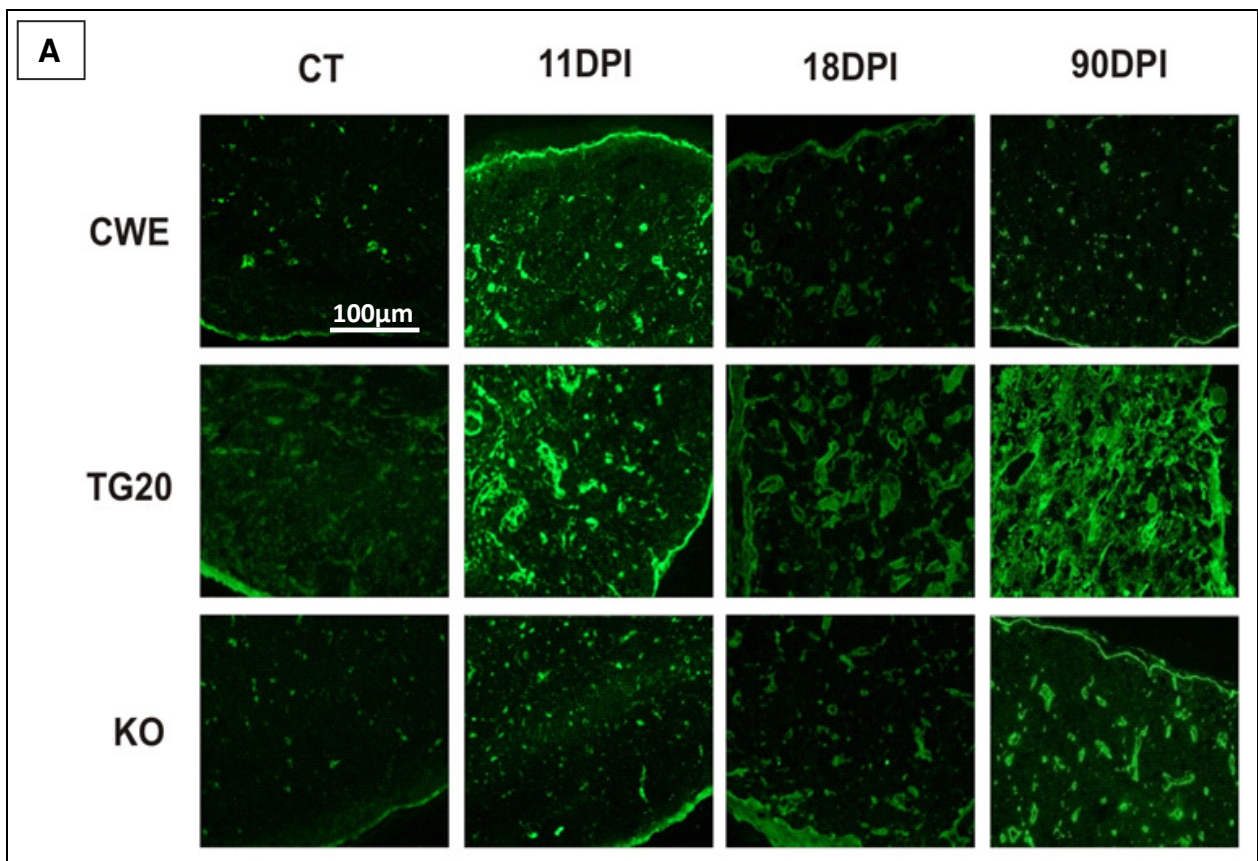


Figura 4.17. Deposição de laminina no timo durante cinética de infecção. As imagens demonstram que o grupo transgênico apresenta maior deposição de laminina no tecido quando comparado aos outros grupos. **(A)** Análise por imunohistoquímica da expressão de laminina no timo em animais com diferentes níveis de PrP^c. Imagens representativas de um animal por grupo. Aumento de 20x. **(B)** Média de intensidade de fluorescência (MFI) a partir da análise morfométrica das imagens obtidas de 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. MFI por área de imagem. * p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001. **CWE vs TG20** , **KO vs TG20** e **CWE vs KO**.

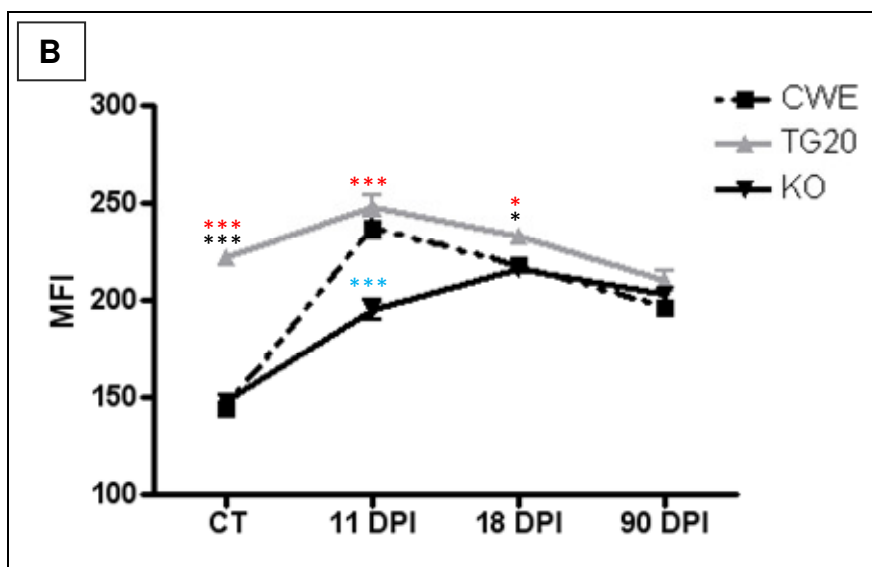
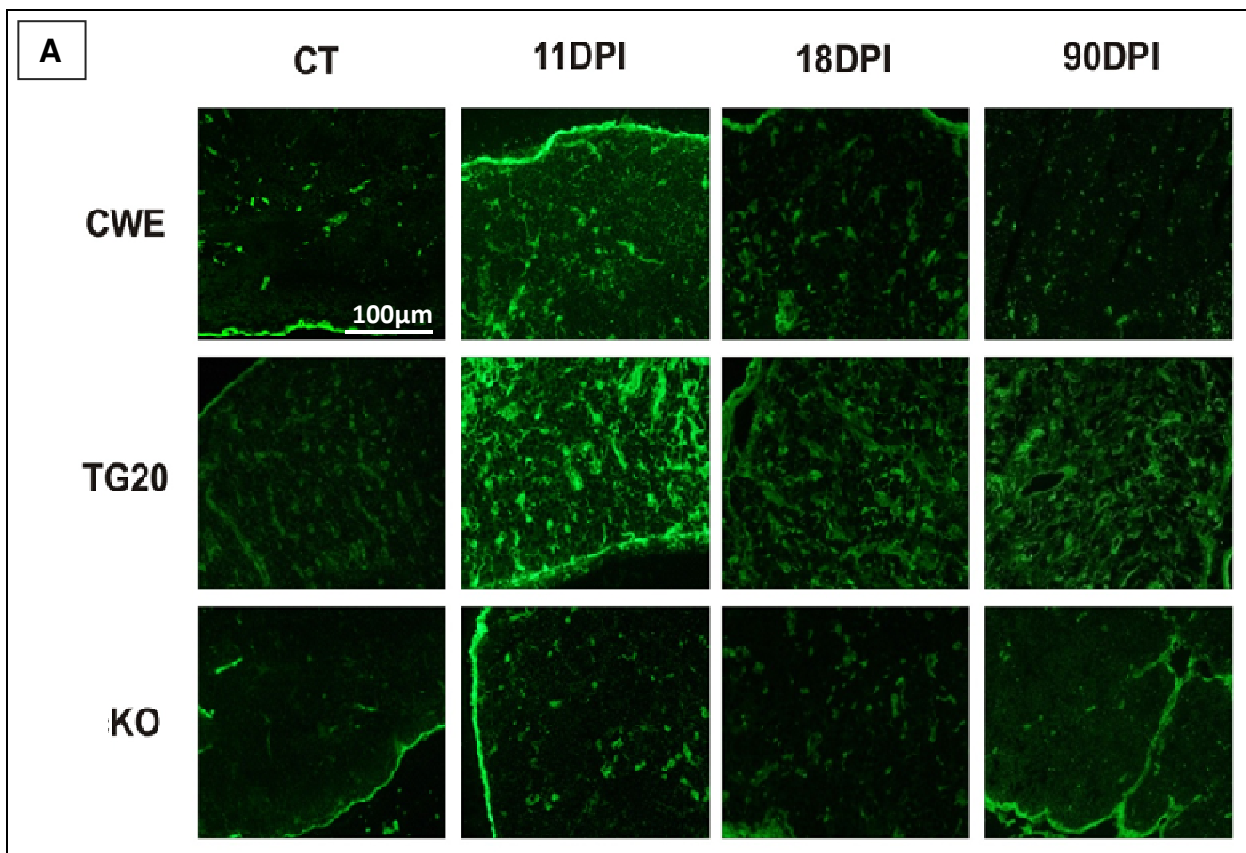


Figura 4.18. Deposição de fibronectina no timo durante cinética de infecção. As imagens demonstram que o grupo transgênico apresenta maior deposição de fibronectina no tecido quando comparado aos outros grupos. **(A)** Análise por imunohistoquímica da expressão de fibronectina no timo de animais com diferentes níveis de PrP^c. Imagens representativas de um animal por grupo. Aumento de 20x. **(B)** Média de intensidade de fluorescência (MFI) a partir da análise morfométrica das imagens obtidas de 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. MFI por área de imagem. * p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20 , KO vs TG20 e CWE vs KO.

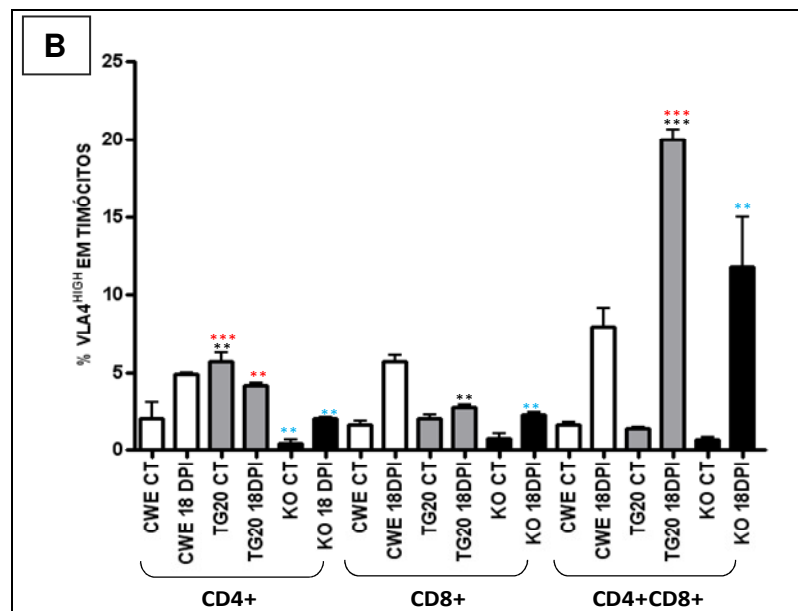
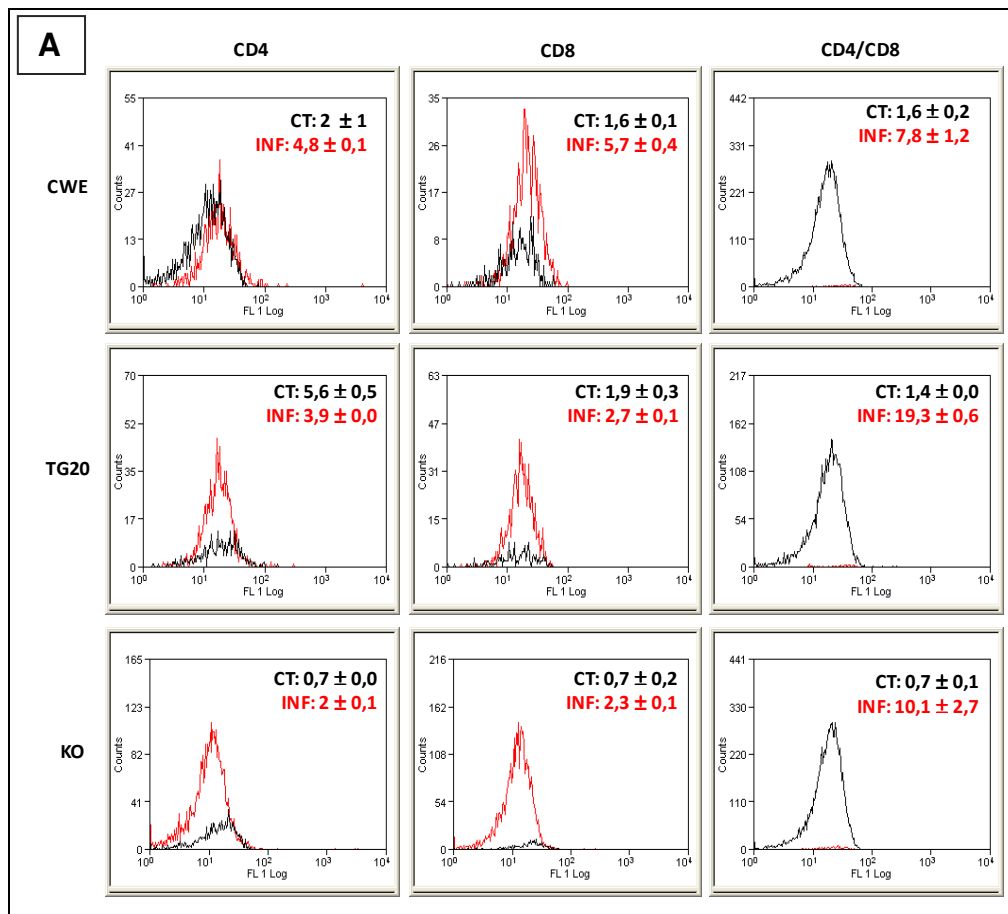


Figura 4.19. Análise citofluorimétrica de subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, e de fenótipo VLA-4^{HIGH}, na fase aguda da infecção experimental. (A) Histograma representativo de timócitos onde animais com diferentes níveis de PrP^C foram analisados de acordo com a expressão de CD49d em timócitos demonstrando aumento nos números relativos de células VLA-4^{HIGH} em um ponto da fase aguda da infecção (18 DPI). Dados representativos de um animal por grupo. **(B)** Valores expressos em médias de porcentagens e + erro padrão, havendo 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

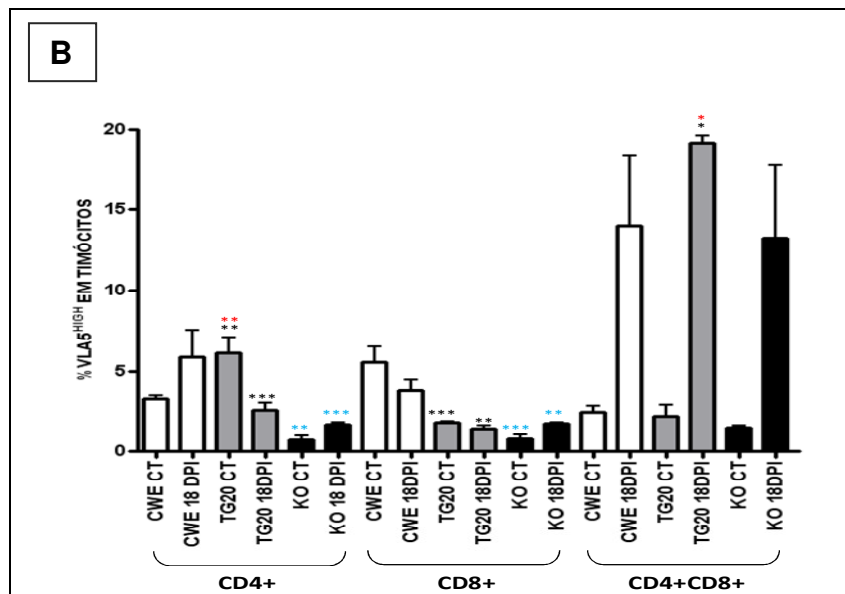
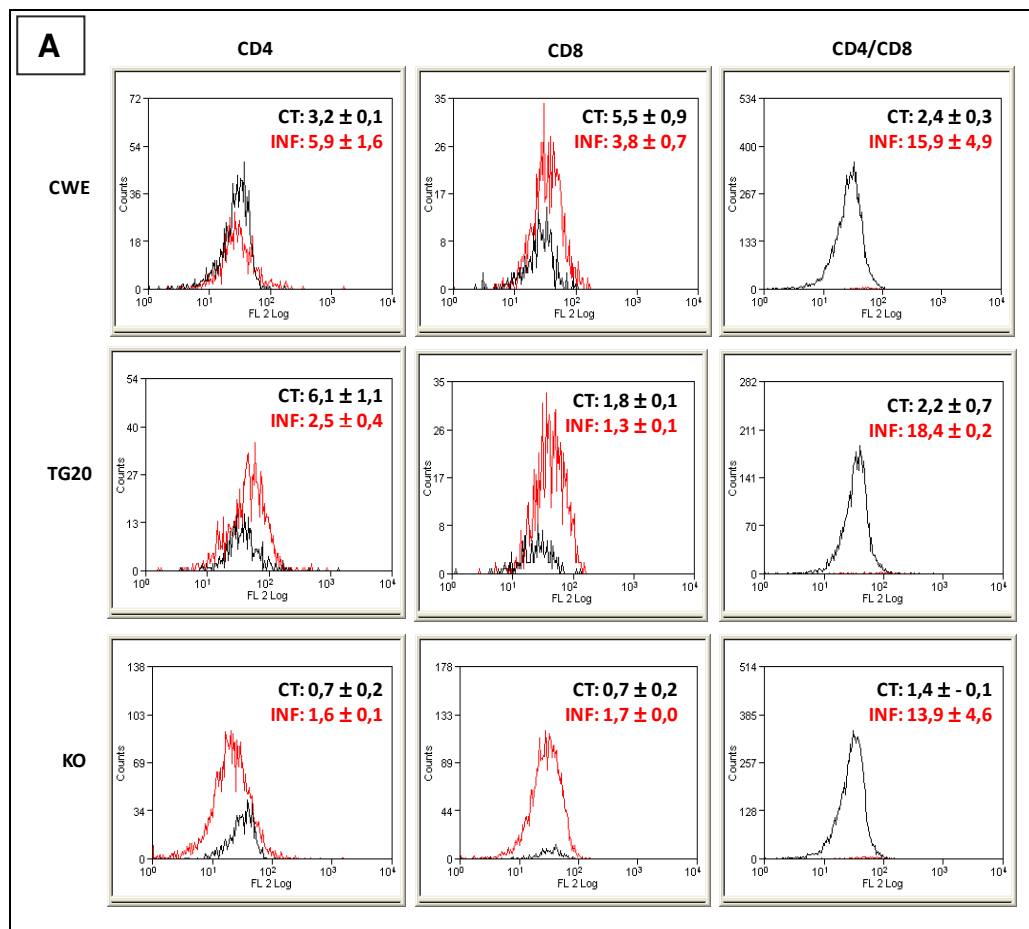


Figura 4.20. Análise citofluorimétrica de subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, e de fenótipo VLA-5^{HIGH}, na fase aguda da infecção experimental. (A) Histograma representativo de timócitos onde animais com diferentes níveis de PrP^C foram analisados de acordo com a expressão de CD49e em timócitos demonstrando aumento nos números relativos de células VLA-5^{HIGH} em um ponto da fase aguda da infecção (18 DPI). Dados representativos de um animal por grupo. **(B)** Valores expressos em porcentagens com médias + erro padrão, havendo 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

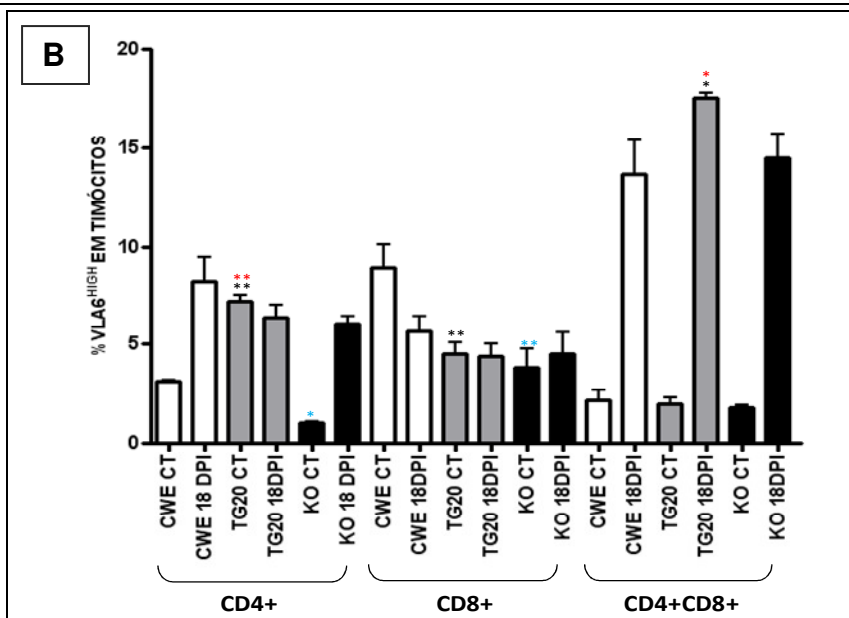
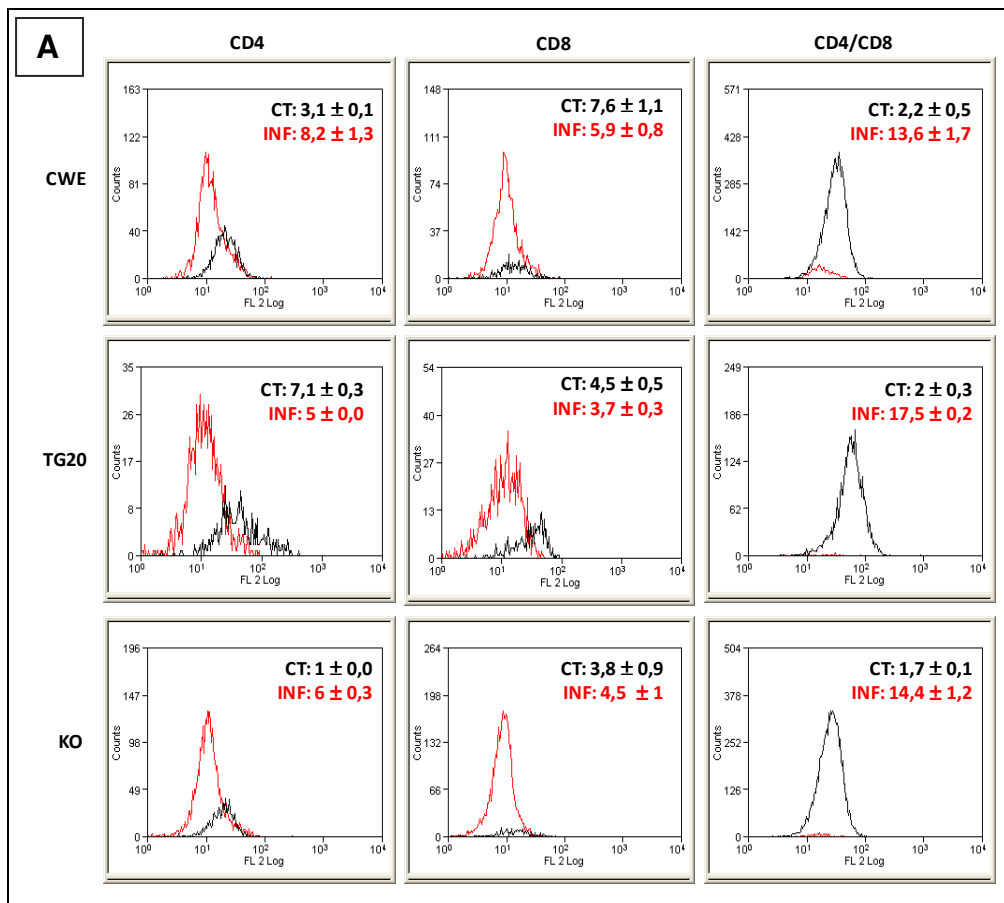


Figura 4.21. Análise citofluorimétrica de subpopulações de timócitos definidas por CD4 e CD8, e de fenótipo VLA-6^{HIGH}, na fase aguda da infecção experimental. (A) Histograma representativo de timócitos onde animais com diferentes níveis de PrP^c foram analisados de acordo com a expressão de CD49f em timócitos demonstrando aumento nos números relativos de células VLA-6^{HIGH} em um ponto da fase aguda da infecção (18 DPI). Dados representativos de um animal por grupo. **(B)** Valores expressos em porcentagens com médias + erro padrão, havendo 3 animais por grupo. DPI = Dias Pós Infecção e CT = animais não infectados em 0 DPI. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001. CWE vs TG20, KO vs TG20 e CWE vs KO.

5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste trabalho mostram que camundongos apresentando superexpressão de PrP^C, associada a uma hipoplasia tímica e a um baixo número de linfócitos em órgão linfóides periféricos, apresentam maior susceptibilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Em trabalhos anteriores, demonstrou-se que os camundongos TG20, transgênicos para PrP^C, apresentam uma alteração severa no processo de diferenciação intratímica, no qual, além da hipoplasia do órgão, com número total de timócitos muito reduzido, há também um acúmulo de células imaturas no estágio de CD4-CD8- (Jouvin-Marche et al, 2006; Terra-Granado et al 2007). Mais recentemente, foi visto ainda em nosso Laboratório que também os órgãos linfóides secundários desses mesmos animais apresentam número reduzido de linfócitos T CD4+ e CD8+. É importante salientar que camundongos nocautes para PrP^C (KO) não apresentam essas alterações (Terra-Granado, 2009).

Utilizando a infecção experimental pelo *T. cruzi* como modelo de ativação do sistema imune, procuramos avaliar se os animais TG20 exibiam algum tipo de imunodeficiência ligada a células T, que os impedissem de desenvolver uma resposta imune adequada e sobreviver a uma infecção com número relativamente baixo de formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Comparamos os dados obtidos nestes animais, com camundongos normais tipo selvagem (CWE), e ainda com animais nocautes para PrP^C (KO).

No primeiro grupo de experimentos, vimos que os animais TG20 (transgênicos para PrP^C), apresentaram sobrevida muito inferior à dos outros grupos (CWE e KO) na fase aguda da infecção. Per se, estes dados já indicam fortemente que os camundongos que superexpressam PrP^C são muito mais susceptíveis à infecção. Em nossas condições de infecção com baixo inóculo parasitário (100 tripomastigotas/animal), a qual possibilita a sobrevivência dos animais CWE e KO, a taxa de sobrevida do grupo TG20 foi bastante reduzida.

O controle da parasitemia pelos camundongos TG20 também foi significativamente diferente em relação aos animais CWE e KO. Vimos uma maior parasitemia nos camundongos TG20 durante a fase aguda da infecção, período no qual a maioria absoluta dos animais não sobrevive. No entanto, aqueles animais desse

mesmo grupo que chegaram à fase tardia, conseguiram controlar e praticamente zerar a parasitemia.

É interessante notar que o grupo KO apresentou taxas muito baixas de parasitas circulantes no curso da infecção comparado aos outros grupos. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por Ingram e colaboradores (2009) com o modelo de infecção com *S. pyogenes* em animais PrP^C nocautes.

Assim, se de um lado nossos dados corroboram a hipótese inicial de que a superexpressão de PrP^C poderia levar à diminuição da resistência à infecção, também é plausível pensar que a ausência de PrP^C talvez permita uma maior resistência. Pretendemos testar esta hipótese utilizando inóculos maiores do parasita, e realizar novos experimentos de curva de sobrevivência.

Um dos parâmetros biológicos mais observados na infecção pelo *T. cruzi* é a presença de um intenso infiltrado inflamatório no tecido muscular de alguns órgãos, principalmente no coração. Esse evento está relacionado à morbidade presente nos indivíduos infectados. Em outros modelos murinos já foi observada um intenso infiltrado linfocitário no tecido cardíaco, bem como a presença de ninhos de amastigotas de *T. cruzi*; a presença do parasita nesse tecido pode estar contribuindo com a manutenção de uma resposta inflamatória aguda e crônica no local, que por sua vez poderiam levar a eventos de autoimunidade relacionados à doença (Kierszenbaum, 2005).

Nos camundongos utilizados no presente trabalho, observamos a evolução de uma intensa infiltração leucocitária no tecido cardíaco. Embora em termos histopatológicos não tenhamos definido qualquer diferença significativa entre os tipos de animais infectados, quando realizamos experimentos com suspensões celulares obtidas a partir de corações, realizamos análises de citometria de fluxo vimos que no grupo TG20 há aumento das subpopulações de linfócitos definidas por CD4 e CD8, na fase aguda da infecção, quando comparado aos outros grupos. Estes dados sugerem que a intensa presença de linfócitos no coração destes animais possa levar mais rapidamente a uma disfunção cardíaca. Além disso, notamos um número aumentado de células CD11b⁺ no coração dos animais TG20, sugerindo a presença maciça de células CD11b⁺, as quais têm papel fundamental na inflamação tecidual.

Dados da literatura demonstram que o aumento da expressão tecidual de moléculas de matriz extracelular, tais como laminina e fibronectina durante infecção parece favorecer os eventos de migração de linfócitos para os tecidos (Silva-Barbosa et

al, 1997). Sendo assim, procuramos avaliar a expressão dessas moléculas no tecido cardíaco e correlacionar com a infiltração linfocitária no local. Observamos aumento de deposição de laminina e fibronectina no tecido cardíaco dos camundongos infectados durante a fase aguda, porém, sem diferenças significativas entre os grupos, embora houvesse uma maior deposição de ambas as proteínas com 18 dias pós-infecção através da análise da média de intensidade de fluorescência (MIF), nos animais TG20. Baseados nessas observações decidimos avaliar primeiramente as subpopulações linfocitárias presentes em órgãos linfóides periféricos como baço e linfonodos subcutâneos e tentar correlacionar essas análises à presença de linfócitos no coração.

Durante infecção pelo *T. cruzi*, o baço e os linfonodos subcutâneos sofrem alterações histológicas e celulares, dentre as quais uma intensa hiperplasia causada por uma resposta proliferativa e ativação policlonal gerada pela infecção (revisado em De Meis et al, 2009). Observamos no presente estudo que os animais infectados apresentaram hiperplasia desses órgãos, confirmando portanto os dados da literatura. Decidimos então avaliar nesses camundongos as subpopulações leucocitárias presentes nesses órgãos durante a infecção, procurando observar se haveria expansão de linfócitos T e B bem como de macrófagos no baço e linfonodos subcutâneos desses indivíduos para também correlacionar com o infiltrado celular no tecido cardíaco. A partir da análise por citofluorimetria, observamos que o grupo TG20 apresentou números absolutos mais baixos de linfócitos T em relação aos outros grupos no baço, porém manteve as taxas de células B e CD11b+ mais altas do que nos outros grupos durante o curso da infecção. Este fato pode estar relacionado à prévia deficiência de diferenciação e exportação de células do timo que ocorre nesse animal, além de possivelmente estar ocorrendo uma expansão preferencial de células B nesse órgão. Nos linfonodos subcutâneos, vimos que em relação ao baço, as taxas das subpopulações de linfócitos T é visivelmente mais baixa no grupo TG20, e mesmo a população de células CD11b+ deste modelo possui números absolutos mais baixos em relação aos outros grupos. A expansão de células B no grupo TG20, apesar de alta, não apresentou diferenças significativas com os outros grupos.

Baseados nessas observações, também decidimos avaliar a expressão de moléculas clássicas de ativação de linfócitos T, e para tal analisamos células de fenótipo CD62L^{LOW}, CD44^{HIGH}, CD25^{LOW} e CD25^{HIGH} e observamos um aumento de linfócitos T CD4+, CD8+ e CD4+CD8+ expressando estes fenótipos de ativação. No

que diz respeito às células CD4+CD8+, é plausível pensar que saíram já ativadas do timo. Experimentos de detecção de recentes emigrantes tímicos serão relevantes na abordagem desta questão.

Em termos de imunorregulação, vale a pena comentar ainda que também vimos aumento no número de células CD4+CD25^{HIGH}, que possivelmente correspondem a células T reguladoras, e tais células podem tanto contribuir no controle de autoimunidade mediada por células T quanto na expansão descontrolada de determinada população responsiva a algum patógeno

De uma maneira geral, esses dados sugerem que aparentemente não há uma correlação direta entre superexpressão de PrP^C e modulação das subpopulações de linfócitos em órgãos linfóides que pudesse levar à alta presença de infiltrado inflamatório no coração desses animais. Decidimos então verificar se células oriundas do timo estariam relacionadas com essa infiltração; Dados anteriores do nosso grupo descrevem que células CD4+CD8+ exportadas do timo de animais infectados pelo *T. cruzi* têm fenótipo de ativação (Morrot et al, 2009, submetido à publicação).

Sendo o timo um órgão-alvo na infecção pelo *T. cruzi* (Savino, 2006), sofrendo diversas alterações no seu microambiente e nos timócitos, tornou-se relevante avaliar a participação desse órgão durante a infecção em modelo com superexpressão de PrP^C onde já foram descritas alterações naturais nessa linhagem relacionadas aos eventos de migração e diferenciação de células T (Jouvin-Marche et al, 2006; Terra-Granado et al, 2007). Baseados nisso, decidimos avaliar o impacto de PrP^C no timo verificando inicialmente parâmetros já descritos na literatura durante a infecção, como atrofia do órgão e massa relativa do mesmo. Nossos resultados demonstraram que o grupo TG20, o qual já possui hipoplasia do timo, também tem depleção celular nesse órgão, porém muito mais intensa quando comparada aos outros grupos. Na fase tardia, tanto os grupos CWE quanto KO apresentaram recuperação significativamente maior, tanto da celularidade do timo, quanto de seu peso relativo se comparados ao grupo TG20. Essa depleção severa de celularidade no timo dos camundongos TG20 pode estar contribuindo para sua maior susceptibilidade à infecção, já que pode estar ocorrendo exportação maciça de células T imaturas CD4+CD8+ para periferia do sistema imune, e mesmo para o coração. Cabe ressaltar que a recuperação substancial dos fenótipos celulares tímicos no grupo KO, observada nos valores absolutos das células sugere uma correlação entre o evento e a ausência de expressão da proteína.

Também analisamos a expressão de laminina e fibronectina no microambiente tímico, bem como seus receptores nos timócitos desses grupos. Observamos que tanto o grupo TG20 quanto CWE, possuem aumento de expressão semelhante dessas moléculas durante a fase aguda da infecção, enquanto que o grupo KO mantém taxas mais baixas no curso da infecção. Receptores de laminina e fibronectina (VLAs) também estão com sua expressão aumentada em células duplo-positivas do grupo TG20. Estas observações sugerem uma correlação entre expressão de PrP^C e expressão de proteínas de matriz no timo na infecção aguda e esse evento pode estar facilitando uma maior exportação de células T imaturas do timo para periferia com possível reflexo nos processos patológicos presentes no tecido cardíaco desses modelos.

Por fim, nossos dados demonstram que uma imunodeficiência causada pela superexpressão de PrP^C resulta em maior susceptibilidade à infecção. Algumas das possibilidades para explicar esse evento seria o aumento da exportação de células T imaturas para órgãos linfóides periféricos e coração no modelo transgênico, porém, ensaios funcionais de migração *in vitro* e *in vivo* seriam necessários para corroborar a hipótese. Como a dose utilizada de inóculo de parasitas é a que está descrita para cronificação de modelos experimentais, também seria relevante avaliar doses mais altas de parasita nos grupos CWE e KO e avaliar se a ausência de PrP^C no sistema pode estar gerando resistência a essa infecção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A & Calella AM. Prions: Protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Ver.* 2009; 89: 1105-52.

Aguzzi A, Baumann F & Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31: 439-77.

Alper T, Cramp WA, Haig DA & Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature.* 1967; 214: 764-6.

Araújo-Jorge TC, Castro SL. Doença de Chagas, Manual para Experimentação Animal. FIOCRUZ. 2000; 134-39, 219-22.

Ballerini C, Gourdain P, Bachy V, Blanchard N, Levavasseur E, Gregoire S, Fontes P, Aucouturier P, Hivroz C & Carnaud C. (2006). Functional implication of cellular prion protein in antigen-driven interactions between T cells and dendritic cells. *J Immunol.* 2006; 176: 7254-62.

Bellinger-Kawahara C, Diener TO, McKinley MP, Groth DF, Smith DR & Prusiner SB. Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. *Virology.* 1987; 160: 271-4.

Borchelt DR, Rogers M, Stahl N, Telling G & Prusiner SB. Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology.* 1993; 3: 319-29.

Brown DR, et al. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* 1997b; 146, 104-12.

Brown DR. Copper and prion disease. *Brain Res Bull.* 2001; 55: 165-73

Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethman H, Lipp HP, De Armond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissman C. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell surface PrP protein. *Nature.* 1992; 356(6370):577-82.

Burthem J, Urban B, Pain A & Roberts DJ. The normal cellular prion protein is strongly expressed by myeloid dendritic cells. *Blood.* 2001; 98: 3733-8.

Caruso P, Burla R, Piersanti S, Cherubini G, Remoli C, Martina Y, Saggio I. Prion expression is activated by Adenovirus 5 infection and affects the adenoviral cycle in human cells. *Virology*. 2009; 385: 343-50.

Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC & Bendheim PE. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*. 1990; 61: 185-92.

Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM & et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapieinfected and uninfected brain. *Nature*. 1985; 315: 331-3.

Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR & Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo J*. 2002; 21: 3317-26.

Coitinho AS, Freitas AR, Lopes MH, Hajj GN, Roesler R, Walz R, Rossato JI, Cammarota M, Izquierdo I, Martins VR & Brentani RR. The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur J Neurosci*. 2006; 24: 3255-64.

Cole TJ, Liddicoat DR, Godfrey DI. Intrathymic glucocorticoid production and thymocyte survival: another piece in the puzzle. *Endocrinol*. 2005; 146(6): 2499-500.

Cordier-Dirikoc S, Zsurger N, Cazareth J, Menard B & Chabry J. Expression profiles of prion and doppel proteins and of their receptors in mouse splenocytes. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 2131-41.

Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulinfactor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, 1974; 49(1): 13-21.

Cotta-de-Almeida V, Bertho AL, Villa-Verde DM, Savino W. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997; 82(2): 125-32.

Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Mendes-da-Cruz DA, Riederer I, De Meis J, Lima-Quaresma KR, Vieira-de-Abreu A, Villa-Verde DM, Savino W. *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol.* 2003; 33(9): 2439-48.

Criado JR, Sánchez-Alavez M, Conti B, Giacchino JL, Wills DN, Henriksen SJ, Race R, Manson JC, Chesebro B, Oldstone MB. Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol. Dis.* 2005; 19(1-2): 255-65.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N. Autoimmunity in Chagas Disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(8): 3541-5.

Da Silva AC, Espinoza AG, Taibi A, Ouaisi A, Minoprio P. A 24000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B cell activator. *Immunol.* 1998; 94: 189-96.

Davies P & Brown DR. The chemistry of copper binding to PrP: is there sufficient evidence to elucidate a role for copper in protein function? *Biochem J.* 2008; 410: 237-44.

De Meis J, Mendes-da-Cruz DA, Farias-de-Oliveira DA, Correa-de-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-deAlmeida V, Bonomo A, Savino W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFR1/TNF pathways. *Microbes and Infection*, 2006, 8: 221-31.

De Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Jul 7;3(7):e417.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called cruzi complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 1-12.

Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas Disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med.* 2002; 195: 401-13.

Dias JCP, Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: Epidemiologia. Guanabara Koogan. 2000; 48-74.

Dodelet VC & Cashman NR. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood.* 1998; 91: 1556-61.

Durig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmucker U, Bieschke J, Duhrsen U & Kretzschmar HA. Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br J Haematol.* 2000; 108: 488-95.

Ermonval M, Mouillet-Richard S, Codogno P, Kellermann O & Botti J. Evolving views in prion glycosylation: functional and pathological implications. *Biochimie.* 2003; 85: 33-45.

Flechsig E & Weissmann C. The role of PrP in health and disease. *Curr Mol Med.* 2004; 4: 337-53.

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ & Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience.* 2002; 113: 177-92.

Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI & Weiss S. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J.* 2001; 20: 5863-75.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 6115-6119.

Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Bauer PG, Savino W, Lagrange PH. Studies on the thymus on Chagas Disease. III – Colonization of thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *trypanosoma cruzi*. *Pathol Biol.* 1991; 39(2): 91-7.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR & Brentani RR. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000a; 76: 85-92.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG & Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett*. 2000b; 482: 257-60.

Hamaty FC. Análise de células CD4+CD25+FoxP3+ no timo de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado, 2008; Inst Oswaldo Cruz-RJ.

Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT & Wang R. (1993). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry*. 1993, 32: 1009-16.

Henrique-Pons A, De Meis J, Cotta-de-Almeida V, Savino W, Araújo-Jorge TC. Fas and Perforin are not required for thymus atrophy induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*. 2004; 107(1-2): 1-4.

Herms J, et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci*. 1999;19, 8866-75.

Higushi M, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology in heart in Chagas Disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res*. 2003; 60: 96-107.

Ingram RJ, Isaacs JD, Kaur G, Lowther DE, Reynolds CJ, Boyton RJ, Collinge J, Jackson GS & Altmann DM. A role of cellular prion protein in programming T-cell cytokine responses in disease. *Faseb J*. 2009; 23: 1672-84.

Isaacs JD, Jackson GS & Altmann DM. The role of the cellular prion protein in the immune system. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146: 1-8.

Jondal M, Pazirandeh A, Okret S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol*. 2004; 25(11): 595-600.

Jouvin-Marche E, Attuil-Audenis V, Aude-Garcia C, Rachidi W, Zabel M, Podevin-Dimster V, Siret C, Huber C, Martinic M, Riondel J, Villiers CL, Favier A, Naquet P, Gesbron JY & Marche PN. Overexpression of cellular prion protein induces an antioxidant environment altering T cell development in the thymus. *J Immunol*, 2006;176: 3490-7.

Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas Disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today*. 1996; 12(10): 396-9.

Kierszbaum F, Szein MB. Mechanisms underlying immunosuppression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1990; 6(8): 261-4.

Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK & Yee VC. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol*. 2001; 8: 770-4.

Kubosaki A, Yusa S, Nasu Y, Nishimura T, Nakamura Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S & Onodera T. Distribution of cellular isoform of prion protein in T lymphocytes and bone marrow, analyzed by wild-type and prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282: 103-7.

Leite de Moraes MC, Coutinho A, Hontenbeiry-Joscowitz M, Minoprio P, Eisen H, Bandeira A. Skewed V betaTCR repertoire of CD8+ T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol*. 1994a; 6(3): 387-92.

Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie –Joskowicks, Dardenne M, Savino W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol*, 1992, 77:95-8.

Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicks M, Leboulanger F, Savino W, Dardenne M, Lepault F. (1991). Studies on the thymus in Chagas Disease. II – Thymocyte subsets fluctuations in *Trypanosoma cruzi* infected mice: relationship to stress. *Scand J Immunol*. 1991, 33(3): 267-75.

Lima FR, Arantes CP, Muras AG, Nomizo R, Brentani RR & Martins VR. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem*. 2007; 103: 2164-76.

- Lima-Martins MV. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite Immunol.* 1985; 7: 367-76.
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I & Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev.* 2008; 88: 673-728.
- Liu T, Li R, Pan T, Liu D, Petersen RB, Wong BS, Gambetti P & Sy MS. Intercellular transfer of the cellular prion protein. *J Biol Chem.* 2002; 277: 47671-8.
- Liu T, Li R, Wong BS, Liu D, Pan T, Petersen RB, Gambetti P & Sy MS. Normal cellular prion protein is preferentially expressed on subpopulations of murine hemopoietic cells. *J Immunol.* 2001; 166: 3733-42.
- Lopes MH, Hajj GN, Muras AG, Mancini GL, Castro RM, Ribeiro KC, Brentani RR, Linden R & Martins VR. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 2005; 25: 11330-9.
- Lotscher, M., Recher, M., Hunziker, L., Klein, M. Immunologically induced, complement dependent up-regulation of the prion protein in the mouse spleen: follicular dendritic cells versus capsule and trabeculae. *J. Immunol.* 2003; 170: 6040–47.
- Lotscher, M., Recher, M., Lang, K.S., Navarini, A., Hunziker, L., Santimaria, R., Glatzel, M., Schwarz, P., Boni, J., Zinkernagel, R.M. Induced prion protein controls immune-activated retroviruses in the mouse spleen. *PLoS ONE.* 2007; 2 (11): e1158.
- Luppi P, Rudert WA, Zanone MM, Stassi G, Truco G, Finegold D. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen driven autoimmune disease. *Circulation.* 1998; 98(8): 777-85.
- Mabbott NA, Brown KL, Manson J & Bruce ME. (1997). T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology,* 1997; 92: 161-5.
- Mantuano-Barradas M, Henrique-Pons A, Araújo-Jorge TC, Di Virgilio F, Coutinho-Silva R, Persechini PM. Extracellular ATP induces cell death in CD4+CD8+ double positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2003; 5(15): 1363-71.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic heart Chagas Disease. *Circulation*. 2007; 115: 1109-23.

Martinez del Hoyo G, Lopez-Bravo M, Metharom P, Ardavin C & Aucouturier P. Prion protein expression by mouse dendritic cells is restricted to the nonplasmacytoid subsets and correlates with the maturation state. *J Immunol*. 2006; 177: 6137-42.

Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma Interferon modulates CD95 (Fas) and CD95L (Fas-L) expression and nitric oxide induced apoptosis during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun*, 1999; 67(8), 3864-71.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM & Brentani RR. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med*. 1997; 3: 1376-82.

Martins VR, Linden MA, Prado R, Walz AC, Sakamoto I, Izquierdo RR. Cellular prion protein: on the Road for functions. *FEBS lett*, 2002; 512: 25-8.

Mattei V, Barenco MG, Tasciotti V, Garofalo T, Longo A, Boller K, Lower J, Misasi R, Montrasio F & Sorice M. Paracrine diffusion of PrP(C) and propagation of prion infectivity by plasma membrane-derived microvesicles. *PLoS One*. 2009; 4: e5057.

Mazzoni IE, Ledebur HC, Jr., Paramithiotis E & Cashman N. Lymphoid signal transduction mechanisms linked to cellular prion protein. *Biochem Cell Biol*. 2005; 83: 644-53.

Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Cotta-de-Almeida V, 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; 36(6): 1486-93.

Minoprio PM. Polyclonal lymphocyte response to murine *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of both T- and B-cell response. *Scand. J. Immunol*. 1986; 24: 661-8.

Mucci J, Hidalgo A, Mocetti E, Argibay PF, Leguizamon MS, Campetella O. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase induced apoptosis on nurse cell complex. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(6): 3896-901.

Nasu-Nishimura Y, Taniuchi Y, Nishimura T, Sakudo A, Nakagima K, Ano Y, Sugiura K, Sakagushi S, Itohara S, Onodera T. Cellular prion protein prevents brain damage after encephalomyocarditis virus infection in mice. Arch Virol. 2008; 153: 1007-12.

Nicolas O, Gavín R, Del Río JÁ. New insights into cellular prion protein (PrP^C) functions: The "yin and yang" of a relevante protein. Brain Res Rev. 2009; 61: 170-84.

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE & et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell. 1985; 40: 735-46.

Paar C, Wurm S, Pfarr W, Sonnleitner A & Wechselberger C. Prion protein resides in membrane microclusters of the immunological synapse during lymphocyte activation. Eur J Cell Biol. 2007; 86: 253-64.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE & et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90: 10962-6

Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzzi A & Raeber AJ. Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. J Biol Chem. 2001; 276: 44627-32.

Perez A, Roggero E, Nicora A, Palazzi J, Del Rey A, Bottasso O. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by a immunoendocrine imbalance. Brain Behav Immunol. 2007; 21(7): 890-900.

Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. Cytokine. 2008; 43: 395-401.

Politopoulou G, Seebach JD, Schmutz M, Schwarz HP & Aguzzi A. Age-related expression of the cellular prion protein in human peripheral blood leukocytes. Haematologica. 2000; 85: 580-7.

Porto-Carreiro I, Fevrier B, Paquet S, Vilette D & Raposo G. Prions and exosomes: from PrP^C trafficking to PrP^{Sc} propagation. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 35: 143-8.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(2): 92-100.

Priola SA & Vorberg I. Molecular aspects of disease pathogenesis in the transmissible spongiform encephalopathies. *Mol Biotechnol.* 2006; 33: 71-88.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* 1982; 216: 136-44.

Prusiner SB. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998b; 95:13363-83.

Rey L. Bases da Parasitologia Médica. Guanabara Koogan. 2002; 27-42.

Ribeiro-dos-Santos R, Laus JL, Mengels J, Savino W. Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in anti heart autoreactivity. *Mem Int Oswaldo Cruz.* 1990; 85: 367-69.

Ribeiro-dos-Santos R, Pirmez C, Savino W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. *Res Immunol.* 1991; 142: 134-7.

Ribeiro-dos-Santos R, Rossi MA, Laus JL, Santana-Silva J, Savino W, Mengels J. Anti CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngenic newborn hearts grafted in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.* 1992; 175(1): 29-39.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, 1996; 382: 180-182.

Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R & Wuthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 1997; 413, 282-8.

Rongyan Z, Xianglong L, Lanhui L, Xiangyun L & Fujun F. Evolution and differentiation of the prion protein gene (PRNP) among species. *J Hered.* 2008; 99: 647-52.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009;104(1): 246-51.

Savino W & Dardenne M. Immune-neuroendocrine interactions. Immunol Today. 1995; 16: 318-22.

Savino W & Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. Endocr Rev. 2000; 21: 412- 43.

Savino W, Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicks M, Dardenne M. Studies on the Thymus on Chagas Disease. I – Changes in thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. Eur J Immunol. 1989; 19: 1727-33.

Savino W, Villa-Verde DMS, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki MP, et al. Cytokines and cell adhesion receptors in regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2007; 18:107-24.

Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. Plos Pathol. 2006; 2(6): e62.

Silva-Barbosa SD, Cotta-de-Almeida V, Riederer I, De Meis J, Dardenne M, Bonomo A, 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 GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammass R, Villa-Verde DM. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. 2007; 170(2): 546-56.

Sorenson JR et al. Prion diseases: copper deficiency states associated with impaired nitrogen monoxide or carbon monoxide transduction and translocation. J. Inorg. Biochem. 2001; 87, 125-27.

Souto RP, Fenandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molec Biochem Parasitol*. 1996; 83: 141-52.

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K & Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 1987; 51: 229-40.

Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*. 1998; 37: 7185-93.

Stuermer CA, Langhorst MF, Wiechers MF, Legler DF, Von Hanwehr SH, Guse AH & Plattner H. PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *Faseb J*. 2004; 18: 1731-3.

Tanowitz HB, Kirschhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas Disease. *Clin Microbiol*. 1992; 5(4): 400-19.

Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ & Prusiner SB. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 7620-4.

Tarleton RL, De Andrade PP, De Andrade CR. Interleukin-2 production in patients with Chagas Disease: correlation with anti parasite antibody responses. *Immunol Lett*. 1988; 17: 229-34.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin in Immunol*. 2007; 19:430-34.

Taylor DR & Hooper NM. The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol*. 2006; 23: 89-99.

Terra-Granado E, Berbert LR, De Meis J, Nomizo R, Martins VR, Savino W, Silva-Barbosa SD. Is there a role for cellular prion protein intrathymic T cell differentiation and migration? *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14: 213-19.

Terra-Granado E. Participação da Proteína Prion Celular na Diferenciação e Migração Intratímica de Linfócitos. Tese de Doutorado, 2009; Inst de Biofísica-UFRJ.

Thrackay A, Budjoso R. PrP^c expression influences the establishment of Herpes simplex virus Type 1 latency. *J Virol.* 2002; 76: 2498-509.

Tsutsui S, Hahn JN, Johnson TA, Ali Z & Jirik FR. Absence of the cellular prion protein exacerbates and prolongs neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2008; 173: 1029-41.

Vitelli-Alvelar DM, Sathler-Alvelar R, Dias JC, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO. Chagasic patients with indeterminate clinical form of disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2006; 62(3): 297-308.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Elói-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA 2005. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2005; 62: 297-308.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25High T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 2006; 145: 81-92.

Warwicker J. Modeling a prion protein dimer: predictions for fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278: 646-52.

Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T & Schatzl HM. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol.* 1999; 289: 1163-78

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR & Martins VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J.* 2002; 21: 3307-16.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcIV. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009; 104(7): 1051-54.