

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

### **Papel das interações mediadas pelos receptores de prolactina e glicocorticoide na atrofia tímica que ocorre na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***

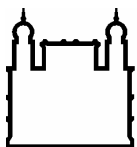
***Ailin Lepletier de Oliveira***

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientador:** Wilson Savino

**RIO DE JANEIRO**

Maio de 2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

### **Papel das interações mediadas pelos receptores de prolactina e glicocorticoide na atrofia tímica que ocorre na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***

***Ailin Lepletier de Oliveira***

**Orientador:** Wilson Savino

**Aprovada em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Examinadores:**

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

Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins

Dra. Valéria de Mello Coelho

**RIO DE JANEIRO**

Maio de 2011

**Dedico esta dissertação à minha família**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à vida e a toda essa lógica misteriosa que nos move e faz tudo ser exatamente como é.

Agradeço à minha família de sangue. À minha mãe, pelo seu amor incondicional e me apoiar sempre nas horas que eu mais precisei; ao meu pai (*in memoriam*), por toda educação, proteção e amizade; ao meu irmão lindo, pedacinho de mim do qual eu tenho muito orgulho. Aos meus avós, tios, primos e padrinhos por tantos ensinamentos.

Aos meus amigos por me mostrarem o verdadeiro sentido da vida e ao Guto pela parceria máxima.

Agradeço à família LPTista, pela paciência, acolhimento, conselhos... por me ensinar a persistir, crescer nas dificuldades e enxergar além do óbvio.

Ao Savino, o “big boss”, por acreditar em mim... pelos puxões de orelha, pela orientação e por todo o crescimento que eu tive nos últimos tempos.

Ao Morrot, pela disponibilidade na elaboração e execução dos experimentos

À Sid linda e maravilhosa pela sua eficiência, competência e alegria.

À equipe maravilhosa de pesquisadores, Déa, Daniella, Juju, Ingo e Dumith por me acolherem em todas as horas que eu precisei. Ao Desio, por cuidar das minhas células e parasitos.

Ao Marcelo e Sandro por me ajudarem com as análises estáticas.

Aos meus queridos colegas de laboratório como um todo, pelas pessoas engrandecedoras que são. Por construírem um ambiente maravilhoso e mostrarem que a união é a melhor estratégia de conquista. Cada um de vocês de um jeito ou de outro me ensinam muito.

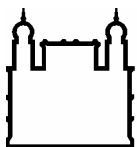
Ao Valmir, Célio e as meninas da limpeza, por manterem tudo bem organizadinho e possibilitarem o nosso trabalho.

À equipe do biotério por cuidarem muito bem dos nossos animais.

Ao pessoal da portaria por garantirem a segurança do nosso trabalho.

À Patrícia Silva e Vinicius Frias, do Laboratório de Inflamação da FIOCRUZ, pelos experimentos de dosagem de corticosterona. Ao Bruno Diaz e Bruno Piva do Laboratório de Inflamação da UFRJ, pelos experimentos de *western-blot*.

Ao Vinicius Cotta pela disponibilidade em revisar essa dissertação e às agências de fomento envolvidas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

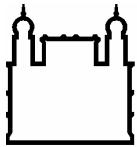
## **Papel das interações mediadas pelos receptores de prolactina e glicocorticoide na atrofia tímica que ocorre na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi***

### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ailin Lepletier de Oliveira**

No curso das doenças infecciosas, os circuitos neuroendócrinos e imunes atuam em conjunto facilitando a resposta do hospedeiro. Alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal são frequentemente associadas a infecções, como as causadas pelo *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, a ação pró-apoptótica de glicocorticóides (GC), sistemicamente aumentados, sobre timócitos CD4+CD8+ (DP), resulta em atrofia tímica. Recentemente, nosso grupo demonstrou expressão alterada de prolactina (PRL), um outro hormônio relacionado ao estresse, durante a infecção por *T. cruzi*. Com base no conhecimento das ações imunomoduladoras de PRL, como a proteção de timócitos da apoptose induzida por GC, pretendemos no presente estudo investigar uma possível função da ativação cruzada entre os receptores intratímicos de PRL e GC (PRLR e GR, respectivamente) no desencadeamento da atrofia tímica induzida por *T. cruzi*. Observamos um circuito intratímico específico de modulação de ambos os hormônios durante a infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos adultos jovens. Enquanto os níveis plasmáticos de PRL e GC apresentaram-se aumentados no início da fase aguda da infecção, quando o processo de atrofia tímica é instaurado, os níveis intratímicos desses hormônios diminuíram, restabelecendo-se posteriormente aos níveis fisiológicos do controle não-infectado. Paralelamente, variações da expressão intratímica de PRLR e GR, ocorreram em acordo com a modulação local de seus ligantes. No início do processo de atrofia tímica, quando muitas células DP estão entrando em apoptose, observamos aumento da expressão de GR e diminuição de PRLR. Em um segundo momento, durante a fase mais tardia da infecção experimental por *T. cruzi*, houve restabelecimento da expressão gênica de ambos os receptores nessas células. Nessa fase, quando o processo de morte celular encontra-se estabilizado e somente algumas células aparentemente mais resistentes à ação pró-apoptótica de GC sobreviveram, observamos aumento da proteína Bcl-xl, um importante fator anti apoptótico induzido por PRL. Em acordo com esses achados, utilizando-se um modelo de indução de apoptose *in vitro*, verificamos maior Suscetibilidade de timócitos à morte induzida por GC nos períodos iniciais da infecção, bem como aos efeitos protetores de PRL, o que não foi observado na fase mais tardia da infecção. Tomados em conjunto, nossos dados apontam para uma função cruzada (*cross-talk*) entre PRLR e GR intratímicos, e que seria responsável pela manutenção da homeostasia tímica. Nesse sentido, alterações desse circuito podem contribuir para o processo de atrofia tímica característico da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## Role of prolactin and glucocorticoid receptor interactions in the thymus atrophy occurring during experimental *Trypanosoma cruzi* infection

### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION

Ailin Lepletier de Oliveira

During infectious diseases, neuroendocrine and immune networks act in concert, facilitating host response. Disorders in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis are frequently observed associated to infections. It has been demonstrated that increased level of circulating glucocorticoids (GC) systemic levels during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection, the etiological agent of Chaga's disease, results in thymus atrophy. Such steroid can trigger apoptosis on cortical thymocytes bearing the phenotype  $CD4^+CD8^+$  (DP) via a specific glucocorticoid receptor (GR). Changes in thymocyte development may have an important consequence for the disease, i.e., further autoimmune reactions. Recently our group demonstrated altered expression of prolactin (PRL), another hormone related to stress, during *T. cruzi* infection. Based on studies showing expression of PRL receptors (PRLR) on lymphocytes, and its effects on growth, differentiation, and apoptosis in lymphoid cells, this hormone is supposed to function as an immunomodulator. Furthermore, prolactin protects T cells from GC-induced apoptosis both *in vivo* and *in vitro*, which corroborates to this hypothesis. Based on these data, here we aim to investigate the possible role of intrathymic GR-PRLR cross-talk to the outcome of *T. cruzi* induced thymus atrophy.

Our results demonstrate altered intrathymic PRL and corticosterone levels during the acute phase of *T. cruzi* infection. When the same hormones were evaluated on plasma, a different modulation was detected, suggesting an independence of intrathymic and systemic circuits that may be related to thymus atrophy. Furthermore, we detected the variation of PRLR and GR intrathymic expression, that occurred in accordance to the modulation of their locally produced ligands. The analysis of DP cells that survived to the apoptosis process at the late phase of acute infection, demonstrated increased PRLR expression in parallel to the decrease of GR levels. This receptor expression profile courses with an increase of anti-apoptotic proteins and the stabilization of the thymus atrophy process and seems an important factor for the survival of these cells. Using an *in vitro* model of thymocyte apoptosis induction, we observed that such alterations result in different GC-induced cell death susceptibility as well as an altered answer to prolactin anti-apoptotic effects.

Taken together our results point to an relevant intrathymic PRLR-GR cross-talk involved in thymus homeostasis. In this way, changes of this circuit may contribute to the outcome of the thymus atrophy characteristic of the acute phase of *T. cruzi* infection.

# ÍNDICE

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	VI
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Aspectos Gerais do Timo.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Composição do microambiente tímico.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3. Timopoiese: Diferenciação de células T<math>\alpha\beta</math> e seleção intratímica.....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Apoptose de células T durante os eventos de seleção.....	20
1.3.1.1. Via intrínseca de apoptose.....	21
1.3.1.2. Via extrínseca de apoptose.....	22
<b>1.4. Regulação neuroendócrina do timo.....</b>	<b>24</b>
1.4.1. Hormônios de estresse.....	27
1.4.1.1. Glicocorticóides: síntese, expressão e sinalização.....	27
1.4.1.2. Mecanismos moleculares e celulares da apoptose induzida por GC em células T .	30
1.4.1.3. Produção intratímica de GC.....	33
1.4.1.4. Variação da susceptibilidade de timócitos à morte celular induzida por GC.....	34
1.4.1.5. Participação de GC no desenvolvimento de células T.....	35
1.4.1.6. Prolactina: síntese, expressão e sinalização.....	36
<b>1.5. Alterações neuroimunoendócrinas durante a infecção por <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA GERAL DO TRABALHO E OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Animais e infecção por <i>T. cruzi</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2. Caracterização das subpopulações de timócitos através de citometria de fluxo.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3. Verificação de Expressão Gênica por PCR em tempo real.....</b>	<b>46</b>
3.3.1. Obtenção das amostras.....	46
3.3.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	47
<b>3.4. Dosagem de corticosterona por radioensaio.....</b>	<b>48</b>
<b>3.5. Dosagem de prolactina plasmática por ensaio imunoenzimático.....</b>	<b>49</b>
<b>3.6. Expressão intratímica de prolactina e receptor de glicocorticóide.....</b>	<b>49</b>
<b>3.7. Expressão intratímica de Bax e Bcl-xl.....</b>	<b>50</b>

3.8. Ensaio <i>in vitro</i> de indução/proteção de morte celular por glicocorticóide e prolactina.....	51
3.9. Análise Estatística.....	51
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
4.1. Caracterização da atrofia tímica durante a fase aguda da infecção experimental por <i>T. cruzi</i> .....	52
4.2. Circuito intratímico de glicocorticóide durante a infecção experimental por <i>T. cruzi</i> .....	56
4.3. Efeito da infecção experimental por <i>T. cruzi</i> sobre a modulação intratímica de prolactina e seu receptor .....	63
4.4. Suscetibilidade de timócitos à morte celular induzida por glicocorticóide: efeito protetor de prolactina.....	67
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>76</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estágios sucessivos de diferenciação intratímica de células T expressando TCR $\alpha\beta$ , a partir de células-tronco hematopoiéticas.....	<b>20</b>
<b>Figura 1.2.</b> Vias de apoptose.....	<b>23</b>
<b>Figura 1.3.</b> Esquema ilustrativo da via de biossíntese de GC em camundongos e humanos...28	
<b>Figura 1.4.</b> Representação esquemática das vias de sinalização acopladas ao receptor de prolactina (PRLR).....	<b>41</b>
<b>Figura 4.1.</b> Análise da atrofia tímica induzida pela infecção experimental por <i>T. cruzi</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 4.2.</b> Apoptose em subpopulações de timócitos durante a fase aguda da infecção por <i>T. cruzi</i> .....	<b>54</b>
<b>Figura 4.3.</b> Expressão de Bcl-xl e BAX durante a atrofia tímica induzida por <i>T. cruzi</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 4.4.</b> Expressão gênica de GR, StaR e Cyp11A em subpopulações de timócitos durante a atrofia tímica decorrente da infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 4.5.</b> Expressão intratímica de receptor de glicocorticóide durante a atrofia tímica induzida pela infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 4.6.</b> Quantificação de corticosterona intratímica e plasmática.....	<b>60</b>
<b>Figura 4.7.</b> Relação entre corticosterona intratímica e expressão de GR em DP.....	<b>61</b>
<b>Figura 4.8.</b> Expressão intratímica de 11beta-HSD1 e 11beta-HSD2 durante a atrofia tímica decorrente da infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	<b>62</b>
<b>Figura 4.9.</b> Expressão gênica de PRLR e PRL em subpopulações de timócitos durante a atrofia tímica decorrente da infecção pelo <i>T. cruzi</i> .....	<b>64</b>
<b>Figura 4.10.</b> Expressão intratímica de PRL.....	<b>65</b>
<b>Figura 4.11.</b> Dosagem de PRL plasmática.....	<b>66</b>
<b>Figura 4.12.</b> Variação da suscetibilidade de timócitos à apoptose induzida por dexametasona entre os diferentes dias da cinética de infecção.....	<b>68</b>
<b>Figura 4.13.</b> Verificação da atividade anti apoptótica de PRL sobre timócitos obtidos em diferentes dias da infecção.....	<b>69</b>
<b>Figura 5.1.</b> Hipótese de interações entre GR e PRLR na célula DP durante a atrofia tímica causada por <i>T. cruzi</i> .....	<b>75</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Caracterização das principais moléculas envolvidas na timopoiese.....	16
--	----

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

- 3 $\beta$ -HSD:**  $\beta$ 3-hidroxiesterase desidrogenase
- ACTH:** Hormônio adrenocorticotrófico
- AIRE:** Regulador autoimune
- CD:** “*cluster of differentiation*”
- CMJ:** Junção cortiço-medular
- CRH:** Hormônio liberador de corticotrofina
- cTEC:** Célula epitelial cortical tímica
- CYP:** Citocromo P450
- DN:** Timócito duplo-negativo
- DNA:** Ácido desoxidorribonucleico
- DP:** Timócito duplo-positivo
- DPI:** Dias pós-infecção
- ECM:** Matriz extracelular
- FADD:** Domínio de morte associado à Fas
- FTOC:** Cultura de órgão de timo fetal
- GC:** Glicocorticóide
- GH:** Hormônio de crescimento
- GR:** Receptor de glicocorticóide
- HPA:** Hipotálamo-hipófise-adrenal
- K5 e K8:** Citoqueratina 5 e 8
- MAPK:** Proteína quinase ativada por macrófago
- MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade
- mTEC:** Célula epitelial medular tímica
- PIT-1:** Fator de transcrição específico da hipófise tipo 1
- PRL:** Prolactina
- PRLR:** Receptor de prolactina
- RAG:** Gene ativador de recombinase
- RNA:** Ácido ribonucleico
- SOCS:** Supressor de sinalização de citocina
- SP:** Timócito simples-positivo
- STAR:** Proteína reguladora aguda esteroidogênica
- STAT:** Proteínas tradutoras de sinal e ativadoras de transcrição
- TCR:** Receptor de célula T
- TDC:** Célula dendrítica tímica
- TRA:** Antígeno de restrição tecidual

## **1. INTRODUÇÃO**

Estudos em nosso Laboratório têm evidenciado o timo como um importante alvo em infecções agudas, particularmente na infecção chagásica experimental. Este órgão linfóide primário é responsável pela maturação de linfócitos T, que expressam uma ampla variedade de repertório de receptor de células T (TCR) capaz de reconhecer antígenos não-próprios e gerar, direta ou indiretamente resposta imune contra um agente estranho.

A homeostasia do timo está relacionada ao equilíbrio neuroimunoendócrino do indivíduo. Animais infectados por *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, apresentam uma severa atrofia tímica, com depleção de timócitos duplo-positivos (DP), simultaneamente à liberação anormal de células imaturas potencialmente autorreativas, para a periferia do sistema imune. Sabe-se que tais alterações tímicas decorrem em parte da ação de hormônios glicocorticóides (GC) sobre o timo, cujos níveis plasmáticos encontram-se bastante elevados em modelos experimentais de infecção aguda. Por outro lado, pouco se sabe sobre o papel de outro hormônio imunorregulador relacionado ao estresse, a prolactina (PRL), sabidamente produzida por timócitos, e que parece contrabalancear os efeitos imunossupressores de glicocorticóides (GC).

Considerando esses dados, pretendemos no presente trabalho, verificar a interação das vias intratímicas de PRL e GR no processo de atrofia tímica que ocorre durante a infecção chagásica experimental.

### **1.1. Aspectos Gerais do Timo**

Como mencionamos acima, o timo é um órgão linfóide primário que promove o desenvolvimento e a formação do repertório de linfócitos T. Situa-se no mediastino anterior, próximo do coração e de grandes vasos da base. Possui dois lobos envolvidos por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo que penetra no órgão através de prolongamentos ou septos que, ao se unirem, dividem o órgão em lóbulos. Os septos, formados por fibroblastos e matriz extracelular enriquecida em colágeno tipo I, partem da cápsula e penetram no parênquima do timo chegando às regiões de interseção entre córtex e medula, delimitando os lóbulos tímicos e carreando vasos sanguíneos (Crivellato et al., 2004). Cada lóbulo tímico possui quatro regiões que podem ser demarcadas

por parâmetros histológicos e de diferenciação de timócitos: região subcapsular, cortical, cortiço-medular e medular. A parte periférica de cada lóbulo, denominada córtex, é formada por tecido linfóide denso e contém a maioria dos timócitos relativamente imaturos e em proliferação, enquanto a porção central ou medula é constituída por tecido linfóide frouxo e contém as células maduras (Nitta et al., 2008). O microambiente de cada lóbulo tímico é essencialmente formado por uma rede de células epiteliais, macrófagos e células dendríticas e ainda uma rede de moléculas de matriz extracelular (ECM), por entre as quais migram e interagem os timócitos - designação geral das células em diferentes estágios de diferenciação que vão dar origem aos linfócitos T maduros.

O timo se mantém em crescimento até a 10.<sup>a</sup> semana de idade pós-natal, com intensa atividade mitótica de timócitos, passando então a sofrer perda da massa linfocitária, principalmente em seu córtex, fenômeno esse denominado involução tímica natural (Aspinall & Andrew, 2000). A região cortical pode desaparecer completamente, enquanto os remanescentes medulares persistem, e é possível que a diferenciação de células T no timo continue durante toda a vida do indivíduo adulto, ainda que em taxas muito reduzidas. Além disso, observa-se com o passar da idade a presença de quantidades crescentes de tecido adiposo no parênquima do órgão, o qual parece surgir de precursores de tecido conjuntivo intralobular (Dixit et al., 2010). A atrofia tímica está associada à sensibilidade dos linfócitos T corticais à ação dos corticóides (Pazirandeh et al., 2004), podendo ser acelerada em resposta a estímulos de infecções agudas, estresse e desnutrição (Savino et al., 2007).

Os progenitores de linfócitos T que se desenvolvem no timo são derivados de células-tronco hematopoiéticas que migram ativamente para o órgão, interagindo com o microambiente cortical e medular através de interações célula-célula e célula-ECM ou ainda através de fatores solúveis. Estas interações celulares determinam a migração e diferenciação dos precursores (von Boehmer et al., 2003; von Boehmer, 2004; Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007), que são comumente caracterizadas pela expressão temporal e coordenada de proteínas de superfície celular, que incluem dentre outras, as moléculas CD25, CD44, CD4, CD8 e o TCR, acoplado ao complexo CD3.

Conseqüentemente, a interação dos timócitos com o microambiente tímico e sua gradual diferenciação (Savino et al., 2002; 2004; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007) gera um repertório intratímico de células T, diverso e funcional, restrito ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e tolerante aos antígenos próprios do organismo. Os linfócitos T maduros, assim selecionados no timo, são liberados para a circulação sanguínea e colonizam regiões específicas nos órgãos linfóides periféricos, as chamadas áreas timo-dependentes. Nestes locais, os linfócitos T ativados poderão proliferar em resposta a um determinado estímulo antigênico, e em seguida migrar para sítios específicos, onde irão exercer sua atividade efetora. Portanto, a formação do repertório de células T consiste em etapas determinantes durante o desenvolvimento dos timócitos. A dinâmica de migração dos timócitos em desenvolvimento através dos distintos compartimentos tímicos é crucial para a seleção e formação deste repertório de células T, que será discutida detalhadamente nas seções posteriores.

## **1.2. Composição do microambiente tímico**

As células epiteliais tímicas compõem a maior parte do microambiente tímico (Savino et al., 2003; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta et al., 2008). Podem ser classificadas em corticais ou medulares de acordo com a localização e expressão diferencial de citoqueratina. Ao contrário das TEC corticais (cTEC) que expressam K8 em condições fisiológicas, as TEC medulares (mTEC) expressam K5.

As cTEC são caracterizadas fenotipicamente com base na expressão dual de EpCAM1 e Ly51 (Derbinski et al., 2001). São fundamentais no processo de recrutamento de precursores hematopoiéticos e comprometimento dessas células com a linhagem T, o que está relacionado à expressão de ligantes de Notch e de diferentes integrinas, além da produção de proteínas da ECM e de citocinas por essas células (Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta et al., 2008). Tais características também estão relacionadas à migração de timócitos durante o processo de diferenciação intratímica, rearranjo de TCR e seleção positiva, etapa essa mediada pela expressão funcional de moléculas MHC de classe I e II na superfície das cTEC.

Na região cortical do timo também encontramos complexos linfoepiteliais, as células nurse tímicas, que estão arranjadas de forma a criar um microambiente especial para a diferenciação e proliferação de timócitos através de interações que ocorrem entre timócitos e TEC, mediadas por fatores solúveis, ECM e interações MHC-TCR. Tais complexos, juntamente a macrófagos tímicos, participariam da eliminação dos timócitos que sofrem apoptose, devido ao rearranjo gênico não-funcional do TCR, ou por não terem sido positivamente selecionados (Hiramine et al., 1996), corroborando dados que demonstram que o tratamento apoptogênico com anticorpo monoclonal anti CD3 gera aumento no número de TNC nos animais tratados (Aguilar et al., 1996).

As TEC medulares (mTEC) apresentam fenótipo EpCAM1<sup>+</sup>Ly51<sup>-</sup> e expressam ambas as moléculas do MHC classe I e classe II. O desenvolvimento e organização anormal de mTEC esta associado à autoimunidade (Derbinski & Kyewsk, 2005). O estabelecimento de tolerância no timo depende de diversos mecanismos que envolvem seleção clonal com deleção e indução de anergia de timócitos que expressam TCR potencialmente autorreativos, com alta especificidade por complexos MHC-peptídeo expressos por células dendríticas e mTEC, além da seleção positiva de células T reguladoras de fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Derbinski et al., 2005; Mathis & Benoist, 2007). A identificação de uma subpopulação de mTEC expressando o gene codificador da proteína AIRE (do Inglês, “*autoimmune regulator*”) indica a importância dessas células para o processo de tolerância central. Essa proteína de 545 aminoácidos apresenta localização nuclear, o que consistente com a sua função reguladora transcripcional de genes-alvo (Buckland, 2006). A deficiência de AIRE resulta na redução da expressão intratímica de antígenos de restrição tecidual (TRA) em mTEC e gera defeitos de indução de tolerância e autoimunidade tecido-específica. Tais dados sugerem que a expressão de AIRE em mTEC permite a expressão intratímica de antígenos próprios gerando a tolerância central de linfócitos T (Boehm et al., 2003; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). Este arranjo intratímico de proteínas próprias da periferia é apresentado aos timócitos diretamente pelas mTEC ou de forma cruzada por células dendríticas durante os eventos de seleção negativa, conforme detalhado adiante.

As células dendríticas do microambiente tímico (TDC) apresentam-se fenotípica e funcionalmente distintas. Estão localizadas principalmente na medula, ao longo dos vasos sanguíneos e especialmente na junção cortico-medular. As TDC convencionais são heterogêneas e formam duas subpopulações, uma principal, que se desenvolve a partir de precursores intratímicos, e uma menor, provavelmente de origem extratímica. Evidências crescentes sugerem que as TDC possam realizar apresentação cruzada de peptídeos próprios para timócitos em desenvolvimento, exercendo um importante papel na seleção negativa e indução de tolerância central por deleção clonal (Heath et al., 2004; Kyewski & Derbinski, 2004), diferentemente do que é visto para as mTEC, cujo efeito tolerogênico está relacionado principalmente à indução de anergia de células T. Além disso, uma segunda população intratímica de TDC plasmacitóides produzem interferons tipo I em situações de ativação, o que pode estar relacionado à participação na diferenciação intratímica.

Como componentes do microambiente tímico presentes em firme contato com timócitos também estão os macrófagos, os quais parecem interferir na diferenciação de timócitos através da apresentação de antígenos e da liberação de citocinas. De forma mais importante, como células fagocitárias, parecem ter importância fundamental na reabsorção de timócitos que sofreram apoptose (Odaka C & Mizuochi T, 2002), fenômeno esse relacionado à seleção negativa e ainda à involução do órgão, e que será discutido mais adiante.

### **1.3. Timopoiese: diferenciação de células $T\alpha\beta$ e seleção intratímica**

Embora o timo gere continuamente linfócitos T, não contém células-tronco com capacidade de autorrenovação. Assim, o repovoamento linfocitário do timo depende do recrutamento periódico de progenitores hematopoiéticos circulantes no sangue (Boehm & Bleul, 2006).

Após a entrada de precursores no timo, ocorrem muitas alterações fenotípicas relacionadas à expressão sequencial de diversas proteínas e rearranjo de genes de TCR. Tais modificações são determinadas pela interação de timócitos com fatores expressos em diferentes nichos do microambiente tímico. Parte de tais interações está relacionada aos eventos de



migração celular. Nesse sentido, foi proposto que o grupo de interações moleculares relativas à migração intratímica de linfócitos caracterizaria um sistema multivetorial que determinaria o tempo e a direção da locomoção celular durante o processo de diferenciação intratímica (Mendes-da-Cruz et al., 2008).

A maturação intratímica de linfócitos T expressando TCR  $\alpha\beta$  pode ser definida com base na expressão diferencial dos marcadores c-kit, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD69 e CD44 em diferentes estágios de desenvolvimento (Tabela 1.1).

<i>Molécula</i>	<i>Participação no desenvolvimento de células T</i>
c-kit	Receptor de fator de crescimento de células tronco (SCF), é densamente expresso nos primeiros estágios de maturação e diminui após o rearranjo de genes que compõem a cadeia $\beta$ do receptor de antígenos de células T (TCR).
complexo CD3	Formado por um conjunto de proteínas associadas ao TCR, é fundamental na transdução do sinal produzido pelo reconhecimento do antígeno.
CD4 e CD8	São glicoproteínas transmembranares; co-receptores associados ao TCR envolvidos no processo de diferenciação e ativação de células T através, respectivamente, da ligação específica ao complexo MHC de classe II e I expressos no microambiente tímico.
HSA ou CD24	Expressa em altos níveis antes do processo de seleção e ausente nas populações pós-selecionadas, é uma proteína envolvida na apoptose mediada por ativação do TCR, participando da sinalização intracelular durante os eventos de seleção negativa.
CD25	Componente do receptor de IL-2, a indução de sua expressão no estágio de DN2 está associada ao comprometimento dessas células com a geração de linfócitos T em detrimento a células dendríticas.
CD69	Marcador de ativação celular recente, sua expressão no timo está também relacionada ao processo de emigração de timócitos diferenciados.
CD44	Receptor de ácido hialurônico, pode interagir também com metaloproteinases. Expresso em timócitos corticais, participa dos processos de interações celulares, adesão e migração.

**Tabela 1.1. Caracterização das principais moléculas envolvidas na timopoiese\*.**  
(Adaptado de Robey, 1990)

A expressão diferencial das glicoproteínas CD4 e CD8 pode ser utilizada para identificar dois pontos principais dos eventos de diferenciação intratímica: a transição de células imaturas  $CD4^-CD8^-$  (DN) para  $CD4^+CD8^+$  (DP), após extensa proliferação celular, e dessas para o estágio de células T maduras  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  simples-positivas (SP), originadas a partir do processo seletivo dependente de expressão do TCR.

Após a entrada no timo, os progenitores T hematopoiéticos iniciam o processo de diferenciação de timócitos dando origem ao estágio DN do desenvolvimento de células T. As células DN1 (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) encontram-se na região cortical, onde, são expressos em níveis mais altos o ligante de Notch, *Delta-like1* (Schmitt et al., 2004). Aparentemente é a sinalização via Notch que induz o comprometimento destas células com a linhagem linfóide (Laiosa et al., 2006; Radtke et al., 1999) enquanto a interleucina-7 (IL-7) e o ligante de CD117 são necessários para a proliferação nesse estágio (Wang et al., 2006).

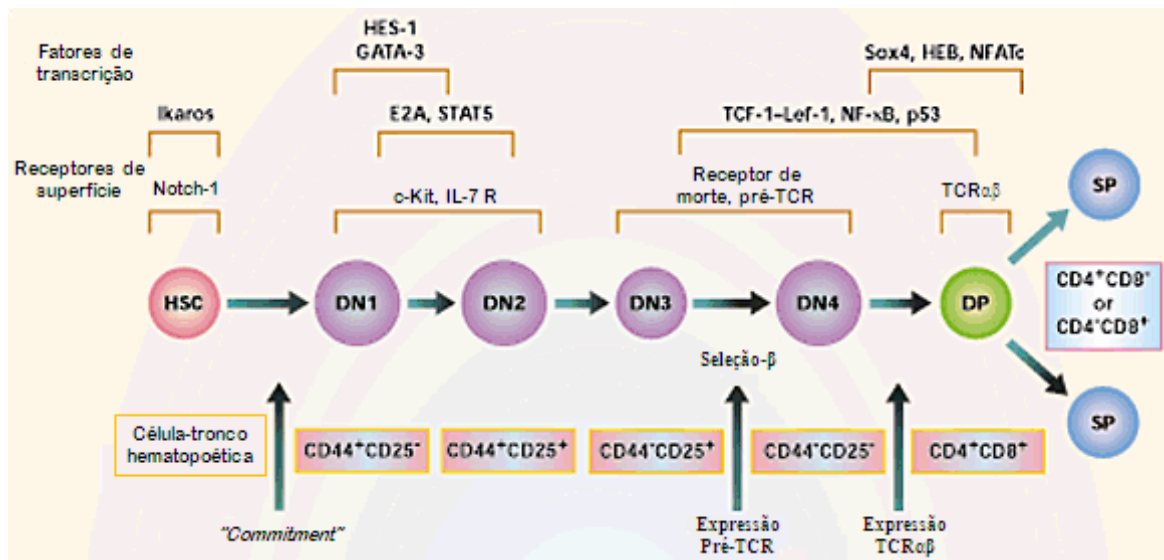
Conforme migram para a zona subcapsular, essas células se diferenciam em DN2 (CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (Capone et al., 1998; Livak et al., 1999), quando a expressão dos genes de ativação de recombinase (RAG) aumenta; aqui é detectado o primeiro rearranjo dos genes para as cadeias TCR $\gamma$  e TCR $\delta$ , mas não para a cadeia TCR $\beta$ , o que só ocorre no estágio DN3 (CD25<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>), marcando irreversivelmente o comprometimento com a linhagem T. Nesta etapa, ocorre um processo de seleção denominado seleção  $\beta$ , quando as células que não finalizam o rearranjo do TCR $\beta$  morrem e somente células bem-sucedidas, que expressam um receptor de célula T imaturo (pré-TCR), sobrevivem e prosseguem no processo de diferenciação. A partir de então, ocorre a transição de DN para DP passando pelo estágio pré-DP ou DN4 (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>), onde extensa proliferação mediada pelo pré-TCR ocorre. Nesse contexto, a expressão de um pré-TCR completo (TCR $\beta$ , CD3 e componentes pré-TCR $\alpha$ ) em DN3 não só estimula a expressão de CD4 e CD8 como também diminui CD25 (Rothenberg et al., 2008), exerce exclusão alélica de TCR $\beta$ , indução do rearranjo de TCR $\alpha$  e uma grande proliferação celular (Penit et al., 1995), desencadeando uma série de eventos que culminam na geração de timócitos DP que não mais se dividem. Ainda no estágio DP os genes de TCR são completamente rearranjados, e o rearranjo produtivo leva à expressão membranar de baixos níveis de TCR $\alpha\beta$  complexados à molécula CD3. Células assim rearranjadas são selecionadas positivamente quanto à capacidade em interagir com o complexo peptídeo-MHC expresso no microambiente tímico (Dervović & Zúñiga-Pflücker, 2010). Similarmente, a maturação dos estágios SP CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, a partir de DP, é também mediada por eventos relacionados à sinalização de TCR; nesse caso envolvendo a forma completa do TCR $\alpha\beta$ .

Os processos de seleção envolvem a afinidade/avidez das interações entre o TCR dos timócitos e o complexo peptídeo-MHC expresso por células apresentadoras de antígeno (Bevan, 1997; Speiser et al., 1989). A seleção positiva resgata os timócitos da morte celular programada (explicada posteriormente) quando há uma avidez moderada na interação TCR/peptídeo-MHC (Mick et al., 2004). Timócitos que não passaram por um rearranjo produtivo de TCR não interagem e morrem por negligência. A partir da seleção positiva são obtidos clones de células T que apresentam um repertório de TCR restrito ao MHC próprio. Ainda nesta etapa, a especificidade dos timócitos pelo MHC classe I ou classe II é considerada como determinante na divergência entre as subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Um modelo para o surgimento das populações SP supõe que durante a seleção positiva as células cessam a expressão de CD8 por negligência de sinal e superexpressam o receptor de IL7 (IL-7R) (Brugnera et al., 2000). Se a perda de sinalização via CD8 não abolir o sinal via TCR, a expressão de CD8 continua “desligada” e passa-se à produção da subpopulação de timócitos CD4<sup>+</sup>. Por outro lado, se a perda de CD8 interrompe o sinal da seleção positiva, a sinalização via IL-7R faz o silenciamento da expressão da molécula CD4, re-indução da expressão da molécula CD8 e, assim, a célula assume o fenótipo CD8<sup>+</sup> (Yu et al., 2003b).

Conforme se diferenciam em células SP, os timócitos migram para a medula tímica e passam por uma nova etapa denominada seleção negativa (Petrie & Zuniga-Pflucker, 2007; Nitta et al., 2008). Nessa etapa, timócitos com TCR potencialmente autorreativos são excluídas por mecanismos que incluem a expressão de AIRE e TRA em células epiteliais e dendríticas tímicas (Boehm et al., 2003; Ciofani & Zuniga-Pflucker, 2007). Dessa forma, células T CD8<sup>+</sup> restritas a MHC de classe I e T CD4<sup>+</sup> restritas a MHC de classe II são geradas de forma a possuírem tolerância a peptídeos próprios, mas capazes de responder a antígenos estranhos expressos no contexto de proteínas de MHC próprias. Alguns timócitos com alta afinidade para auto antígenos apresentam destino alternativo, com propriedade regulatória, caracterizado pela formação de células T CD4<sup>+</sup> imunossupressoras, as denominadas células Treg (Derbinski et al., 2005; Mathis & Benoist, 2007). Desta forma, na medula formam-se os linfócitos T maduros aptos para exercer suas funções efetoras e regulatórias, e

lá permanecem por alguns dias antes de serem liberados ao *pool* linfóide periférico.

Adicionalmente aos sinais pré-TCR e TCR $\alpha\beta$ , outras interações são requeridas. De fato, já foi demonstrado que a ligação de TCR $\alpha\beta$  somente não é suficiente para mediar a seleção positiva ou negativa. Componentes individuais são altamente especializados na sua habilidade de dirigir os eventos de seleção intratímica com as células epiteliais corticais tímicas providenciando a maioria dos sinais para a seleção positiva enquanto as células dendríticas providenciam sinais suficientes para a seleção negativa. Dentre tais sinais destaca-se a sinalização de glicocorticóides, conforme descrito a seguir.



**Figura 1.1. Estágios sucessivos de diferenciação intratímica de células T expressando TCR $\alpha\beta$ , a partir de células-tronco hematopoiéticas.** Os receptores e fatores de transcrição que são críticos para a sobrevivência, diferenciação e proliferação contínua de timócitos estão demonstrados sobre cada estágio do desenvolvimento representado. DN, progenitores CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>; DP, timócitos corticais CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; SP, células T maduras CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; círculos maiores, células cíclicas; círculos menores, células não-cíclicas. (Adaptado de Wu & Strasser, 2001).

### 1.3.1. Apoptose de células T durante os eventos de seleção

A apoptose é definida como uma série de eventos moleculares e morfológicos que envolvem a perda do potencial de membrana mitocondrial, condensação de cromatina, fragmentação de DNA, permeabilidade de membrana e geração de "corpos apoptóticos", sem liberação do conteúdo citoplasmático no exterior (Kerr et al., 1972). Esse tipo de morte celular é

controlado por diferentes genes, que atuam de maneira oposta, ora estimulando, ora inibindo esse processo (Horvitz et al., 2003). Devido a esse controle gênico, a morte por apoptose passou a ser chamada de morte “programada” (Assunção-Guimarães et al., 2004). Mediado por caspases, uma família de cisteína-proteases que clivam seus substratos após resíduos aspartato (Adams, 2003), esse processo culmina na fagocitose das células mortas. O processo de apoptose é fundamental para o desenvolvimento e manutenção do sistema imune e está envolvido nos processos de seleção intratímica que garantem o reconhecimento de um amplo espectro de antígenos estranhos e ajudam a alcançar tolerância e a prevenir autoimunidade. Dessa forma, a apoptose não é somente crítica para o estabelecimento do sistema imune, mas também exerce um importante papel para a finalização das respostas imunes adaptativas, evitando doenças tais como doenças autoimunes e linfoproliferativas (Cory et al., 2002, 2003).

Nos últimos anos, foram caracterizadas duas vias distintas de apoptose em células T (Holtzman et al., 2006). Uma é iniciada por estresse celular ou ligação de alta afinidade a receptores de antígeno durante a seleção negativa de timócitos potencialmente autorreativos. Essa “via intrínseca” é regulada pela interface de membros anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2, em nível mitocondrial. Essa mesma via está envolvida na seleção positiva, quando timócitos incapazes de adquirir sinais de sobrevivência pela sinalização de TCR morrem por negligência. O segundo mecanismo, também conhecido como “via extrínseca”, é ativado pela ligação de receptores de morte celular. Ambas as vias convergem para a ativação de caspase-3 e da nuclease CAD (do Inglês, “*Caspase Activated Deoxyribonuclease*”), responsável pela degradação internucleossomal do DNA; ponto irreversível na maioria das cascatas de apoptose (Enari et al., 1998).

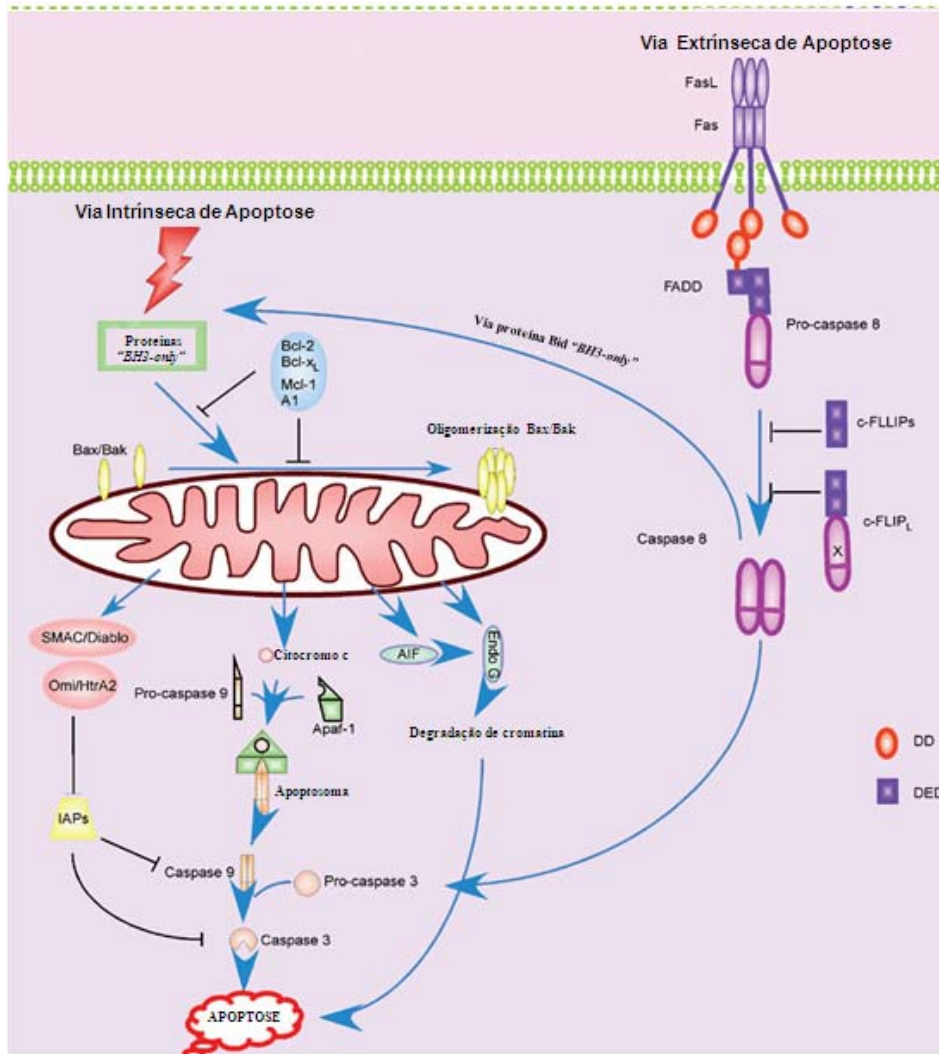
#### **1.3.1.1. Via intrínseca de apoptose**

O início da via intrínseca envolve ruptura da membrana externa da mitocôndria e conseqüente liberação de mediadores apoptóticos, processo este conhecido como permeabilização da membrana externa da mitocôndria ou MOMP (do Inglês, “*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*”). Esse processo é sutilmente regulado pelo balanço entre proteínas anti e pró-

apoptóticas da família Bcl-2. Fatores pró-apoptóticos dessa família, conhecidos como “*BH-3 only*” como Bim, Bad, Puma e Noxa servem como condutores do estímulo apoptótico por ativarem os membros “*multi-domain*”, como as proteínas Bax e Bak. Essas proteínas encontram-se normalmente reprimidas pelas proteínas anti apoptóticas do grupo Bcl2, como Bcl-xl e Bcl-2, que inibem a apoptose por prevenirem a liberação mitocondrial de citocromo c, além de inibirem a geração de espécies reativas de oxigênio e acidificação intracelular, bem como estabilizarem o potencial de membrana da mitocôndria. Após um estímulo de morte, Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo seqüestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial. Porém, quando existe um sinal indutor de apoptose persistente, as proteínas do grupo “*BH-3 only*” irão inibir as do grupo Bcl-2, levando à abertura de poros na membrana externa da mitocôndria pelas proteínas do tipo Bax (Chipuk et al., 2006). Seguindo a formação de poros, o citocromo c é liberado e ocorre formação do conhecido “apoptossomo” (Figura 1.2.). Esse complexo multimérico que contem caspase-9 e APAF-1 (do Inglês, “*Apoptotic Protease Activating Factor-1*”), ativa as caspases efetadoras 3 e 7, que irão desencadear a degradação celular.

### **1.3.1.2. Via extrínseca de apoptose**

A via extrínseca de apoptose é iniciada pela ativação dos receptores de membrana da superfamília de TNF, como os do tipo Fas (CD95/Apo1), também conhecidos como receptores de morte. Essa ativação geralmente ocorre pela ligação do ligante específico Fas-L, e trimerização do receptor, o que leva à ligação de uma molécula de FADD (do Inglês, “*Fas Associated Death Domain*”) na região citoplasmática do mesmo, com consequente ativação de caspase-8 e recrutamento das caspases efetoras 7 e 10 que irão desmontar a estrutura celular (Renatus et al., 2008). Além disso, a caspase-8 pode ativar as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, levando assim à ocorrência de MOMP e liberação de proteínas pró-apoptóticas pela membrana (Figura 1.2.). Assim, a via extrínseca é também conhecida como via amplificadora do sinal, já que contribui para a via mitocondrial de morte (Adams, 2003).



**Figura 1.2. Vias de apoptose.** A via intrínseca envolve a ruptura da membrana externa mitocondrial. Fatores pró-apoptóticos da família Bcl2, conhecidos como “BH-3 only” servem como condutores do estímulo por ativarem os membros “multi-domain”, como as proteínas Bax e Bak que encontram-se normalmente reprimidas pelas proteínas anti apoptóticas do grupo Bcl2, como Bcl-xl e Bcl-2. Quando existe um sinal indutor de apoptose persistente, as proteínas do grupos “BH-3 only” irão inibir as proteínas do grupo Bcl-2, levando à abertura de poros na membrana externa da mitocôndria pelas proteínas “multi-domain”, liberação do citocromo c e formação do conhecido “apoptossomo”, o que resulta em ativação das caspases efetadoras 3 e 7 e degradação celular. Já a via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de membrana da superfamília de TNF, como os do tipo Fas. Quando ativados, geralmente pela ligação do ligante específico Fas-L, ocorre a trimerização do receptor, que por sua vez possibilita a ligação de uma molécula de FADD (do Inglês, “Fas Associated Death Domain”) na região citoplasmática desse receptor, o que leva à ativação de caspase-8 e conseqüente recrutamento das caspases efetoras 7 e 10. Além disso, caspase-8 pode ativar as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, contribuindo para a via mitocondrial de morte celular. (Adaptado de Zhang, 2005).

#### **1.4. Regulação neuroendócrina do timo**

Muitos estudos sobre a fisiologia do sistema imunitário têm sido direcionados para o conhecimento das diversas interações correspondentes ao controle neuroendócrino do sistema imune.

As interações neuroimunoendócrinas foram inicialmente estudadas na busca de uma melhor compreensão a cerca de como o estado psicológico de um indivíduo pode influenciar o desenvolvimento de doenças e a manutenção da saúde. Originalmente, o efeito do estresse e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) sobre o sistema imune foram os aspectos mais estudados, mostrando que vários parâmetros eram afetados (Guyton & Hall, 2002). Com a intensificação desses estudos, foi verificado que havia envolvimento de vários outros eixos neuroendócrinos, tais como hipotálamo-hipófise-tireóide e hipotálamo-hipófise-gônadas, e ainda de vários neurotransmissores. Nesse sentido, observou-se que as conexões através de neurotransmissores poderiam ocorrer não só pela inervação e liberação local em órgãos linfóides, onde foram descritas sinapses neuroimunológicas, como também pela produção desses mediadores pelas próprias células do sistema imune, formando interações bidirecionais através de ligantes e receptores comuns a ambos os sistemas (Savino & Dardenne, 1995; Besedovsky & Del Rey, 1996). Hoje se reconhecem mais de 20 peptídeos produzidos por células do sistema imune, que se imaginava de síntese restrita ao sistema neuroendócrino. Esta síntese, acoplada à presença de peptídeos neurotransmissores e de receptores hormonais nas células do sistema imune, sugere que hormônios que regulam o sistema endócrino podem ter atividade imunomoduladora, funcionando como mediadores da comunicação bidirecional entre os sistemas imune e o neuroendócrino.

Particularmente, a fisiologia do timo é modulada por uma série de circuitos biológicos que incluem aqueles mediados por hormônios polipeptídicos e esteróides, bem como por neuropeptídeos. Muitas interações que ocorrem entre células do microambiente tímico e timócitos em diferenciação estão sob controle neuroendócrino. Já está bem caracterizada a produção intratímica de vários hormônios e neuropeptídeos, tais quais hormônio de crescimento (GH), triiodotironina (T3), glicocorticóides (GC) e prolactina (PRL), bem como a expressão de seus respectivos receptores por



células epiteliais e timócitos, o que sugere a existência de um circuito autócrino/parácrino de modulação intratímica, além do controle endócrino clássico. Essas moléculas influenciam a expressão de MHC pelas células do microambiente tímico, e conseqüentemente as interações MHC-TCR, além de modularem as interações TEC-timócito mediadas por matriz e as junções intercomunicantes tipo *gap* presentes entre TEC (Head et al., 1998; Savino et al., 1998; Alves et al., 2000). A produção de citocinas e a função endócrina tímica são também controladas por essas moléculas. Nesse caso uma interação bidimensional parece ocorrer, uma vez que peptídeos derivados do timo modulam produção hormonal, tanto via eixo hipotálamo-hipófise como também pela ação direta em glândulas. É sabido que T3 estimula a síntese *de novo* de timulina, e que hormônios hipofisários clássicos tais como PRL e GH são capazes de modular sua secreção *in vivo*, tanto no homem como nos animais (Savino et al., 1984; Dardenne et al., 1989; Savino & Dardenne, 2000). Entretanto, também é fato que os hormônios tímicos podem modular a liberação de hormônios hipofisários. A timectomia neonatal diminui o número de grânulos secretórios na adenohipófise (Daneva et al., 1995) enquanto o camundongo “*nude*”, que é atímico, exibe níveis baixos de PRL e GH, além de hormônio folículo-estimulante (FSH) e luteotrófico (LH).

Hormônios hipofisários e esteróides influenciam de forma oposta a viabilidade e proliferação de células tímicas. GH e PRL induzem proliferação *in vitro* de TEC enquanto GC exerce efeito oposto (Timsit et al., 1992). O implante de células GH3, produtoras de GH e PRL, previne a atrofia tímica causada pelo envelhecimento em ratos (Kelley et al., 1986) relacionada, principalmente, ao efeito pró-apoptótico de GC circulante. Paralelamente observou-se redução de células DP, associada à diminuição da viabilidade de timócitos em suspensões celulares de timos neonatais tratados com anticorpos anti PRL capazes de neutralizar PRL exógena. Nesse estudo, um aumento de DN foi observado, sugerindo que PRL regula a manutenção da viabilidade de timócitos durante o estágio DP e possa ser um importante sinal para resgatar essas células da apoptose (Gaufo & Diamond, 1996). Em linhagem derivada de linfoma de rato Nb2, PRL modula a expressão gênica de TCR (Hosokawa et al., 1996). Juntos, esses dados demonstram que os níveis intratímicos de PRL direcionam as vias de diferenciação de células T. Entretanto trabalhos realizados em animais que

não expressam PRLR mostraram resultados que vão contra essa hipótese, uma vez que nesses animais a via de diferenciação intratímica, no que tange a expressão de CD3, CD4 e CD8, parece ser normal (Horseman et al., 1997; Bouchard et al., 1999). De fato, parece que a interação PRL-PRLR não é fundamental para a ontogênese do timo, sendo muito mais necessária para a manutenção da homeostasia do órgão em situações de estresse fisiológico. Corroboram essa hipótese os achados que demonstram que PRL exógena previne, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a atrofia tímica associada a altas doses de GC (Krishnan et al., 2003; Biswas et al., 2006). Estudos recentes realizados em cultivos de timo fetal (FTOC) demonstraram que PRL influencia a sobrevivência e diferenciação de linfócitos pré-T, mecanismo esse mediado por IL-2 (Carreño et al., 2005), bem como a viabilidade e maturação de TDC (Carreño et al., 2004). No que diz respeito à importância de GC na manutenção da homeostase tímica, tem sido apontado um circuito intratímico parácrino/autócrino de grande importância na maturação e eventos de seleção de timócitos. Sob condições normais, GC endógeno previne a morte de timócitos após interação TCR/peptídeo-MHC (Vacchio et al., 1999).

O tráfego de timócitos também é controlado por circuitos neuroendócrinos. Tanto a entrada de precursores de células T, quanto o tráfego intratímico durante as etapas de diferenciação e a saída de células para a periferia do sistema imune são controladas por hormônios. Dados de nosso laboratório demonstraram que o tratamento com hormônio tireoidiano de células epiteliais obtidas do complexo TNC e co-cultivadas com timócitos fetais aumenta a proporção da reconstituição dos complexos linfoepiteliais, indicando que a entrada de timócitos em TNC é regulada por hormônios (Villa-Verde et al., 1993). Estudos adicionais mostraram que tanto a liberação de timócitos de TNC quanto a sua reconstituição são aumentadas em culturas tratadas com PRL, GH ou fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (de Mello-Coelho et al., 1997). Além disso, foi observado que 16 h após uma única injeção intratímica de T3 ou GH ocorreu aumento de recentes emigrantes tímicos em linfonodos subcutâneos (Moura-Carvalho et al., 2007; Smaniotto et al., 2004, 2005).

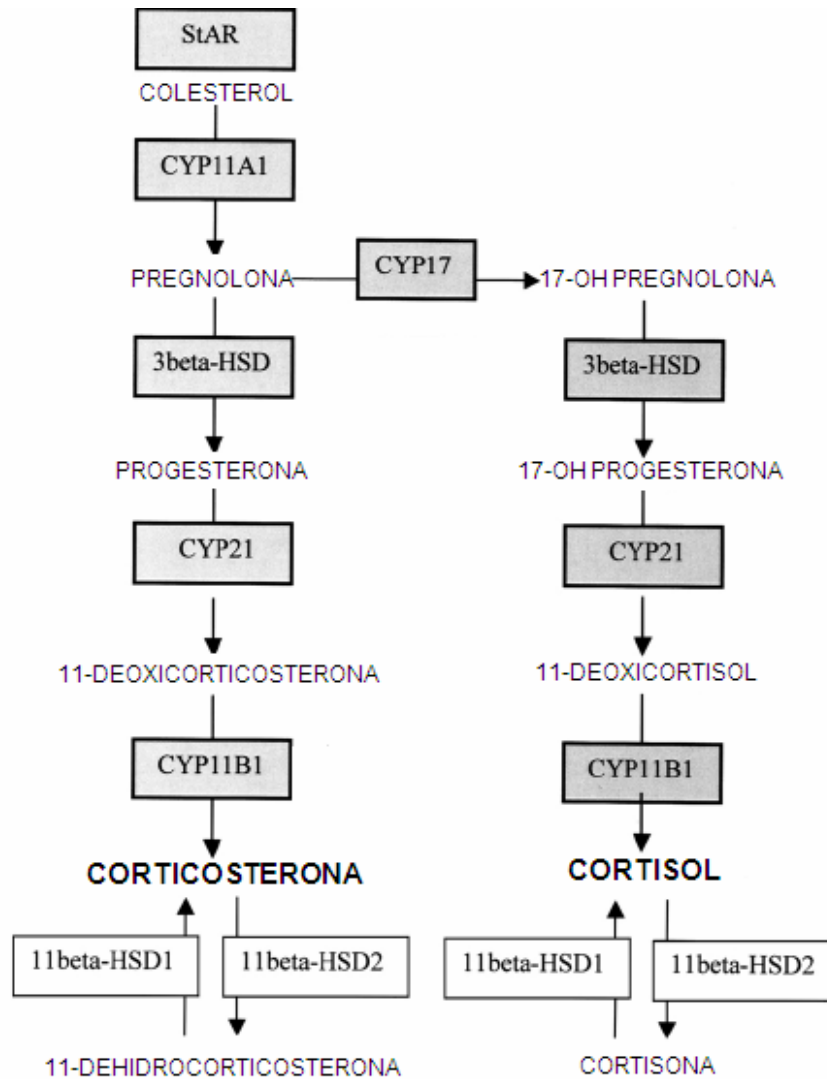
O controle neuroendócrino do timo parece ser mais complexo, e pouco ainda se sabe sobre os possíveis circuitos intratímicos que envolvem a

produção *in situ* desses mediadores, bem como sua influência sobre a timopoiese. O certo é que, independente da via envolvida, tal controle neuroendócrino exerce uma ampla modulação na atividade de genes expressos em células linfóides e do microambiente tímico. Tomando-se em consideração a importância de um maior entendimento a cerca da participação desses hormônios em processos patológicos que acometem o timo, pretendemos no presente estudo investigar as interações de PRL e GC na geração de atrofia tímica infecciosa causada por *T. cruzi*.

#### **1.4.1. Hormônios de estresse**

##### **1.4.1.1. Glicocorticóides: síntese, expressão e sinalização celular**

Glicocorticóides são pequenas moléculas lipofílicas com efeitos potentes em uma grande variedade de vias metabólicas e secretórias, tendo influência profunda na fisiologia de muitos tecidos. São produzidos em altos níveis primariamente na zona fasciculada do córtex da adrenal, embora produção hormonal ectópica também ocorra no cérebro, trato gastro-intestinal e timo (Lechner et al., 2001; Qiao et al., 2008). As enzimas limitantes para a síntese de GC são a proteína reguladora aguda esteroideogênica (StAR), que transfere colesterol através da membrana mitocondrial, e a citocromo P450, família 11, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP11A1). Enzimas adicionais requeridas para a síntese de GC são 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), citocromo P450 21-hidroxilase (CYP21), CYP11B1 e citocromo P450 17-hidroxilase (CYP17) (Figura 1.3.). Nas adrenais de camundongos existe apenas uma pequena expressão da enzima formadora de cortisol CYP17, o que torna a corticosterona a principal forma ativa de GC em camundongos, em contraste ao cortisol, o principal glicocorticóide em humanos.



**Figura 1.3. Esquema ilustrativo da via de biossíntese de GC em camundongos e humanos.** As enzimas limitantes para a síntese de GC são a proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR), que transfere colesterol através da membrana mitocondrial, e a citocromo P450, família 11, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP11A1). Enzimas adicionais requeridas para a síntese de GC são 3β-hidroxiesteroide-desidrogenase (3β-HSD), citocromo P450 21-hidroxilase (CYP21), CYP11B1 e citocromo P450 17-hidroxilase (CYP17); esta última expressa somente em ratos. As setas em duplo sentido indicam o constante equilíbrio de ativação e inativação de GC sintetizado, através das enzimas 11 beta-HSD, respectivamente do tipo 1 e 2. (Adaptado de Qiao, 2008).

A síntese de GC está sob controle do eixo HPA, que controla o nível hormonal no soro (Webster et al., 2002). Esse mecanismo envolve a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em resposta ao estresse e a níveis elevados de citocinas, o que resulta em secreção de GC das glândulas adrenais. Por sua vez GC limita a atividade

do eixo HPA ao nível de hipotálamo e hipófise estabelecendo, dessa forma, uma alça de retroalimentação negativa.

A disponibilidade plasmática de GC segue um padrão circadiano, caracterizado em humanos por altos níveis de manhã e baixos níveis à noite. Já em roedores, esse padrão é inverso (Balsalobre et al., 2000). As moléculas de GC circulam no sangue ligadas a uma proteína carreadora, geralmente uma molécula de globulina ou albumina. A forma livre, não ligada, é a fração biologicamente ativa e constitui aproximadamente 10% do total circulante.

Coletivamente, a ação de GC é controlada em múltiplos níveis por ambos os sistemas imunes e neuroendócrinos e existem evidências da produção de GC em tecidos extra-adrenais, como o timo.

Os efeitos biológicos de GC são mediados por GR, uma molécula de aproximadamente 100kDa majoritariamente localizada no citoplasma complexada a outras proteínas, em geral proteínas de choque térmico, como hsp 90 e as imunofilinas hsp 56 e CyP-40 (Pratt et al., 1996). Como outros membros da superfamília de receptores de hormônios esteróides, GR possui um domínio de ligação ao hormônio, um domínio de ligação ao DNA e um domínio de transativação (Mangelsdorf et al., 1995). Por ser um hormônio lipofílico, GC penetra no citosol e se liga ao GR intracelular, induzindo à translocação do receptor para o núcleo. O complexo GR-GC se liga como um homodímero em sequências específicas de DNA denominadas elementos de resposta a glicocorticóide (GRE) (Louisi et al., 1991). Dessa forma, GR funciona como fator de transativação e transrepressão de muitos genes, incluindo aqueles envolvidos na resposta inflamatória e apoptótica (Jenkins et al., 2001). Embora sejam conhecidos muitos genes suprarregulados em resposta a GC, incluindo alguns importantes para a função, ativação e apoptose de células imunes, como Bcl-x1 (Gascoyne et al., 2003), IκB (Deroo & Archer, 2001), GILZ (D'Adamio et al., 1997) e GITR (Nocentini et al., 1997), existem poucas evidências de que isso ocorra diretamente através de GRE. Genes que foram demonstrados serem diretamente suprarregulados através de GRE *in vivo*, incluem tirosina aminotransferases (Schmid et al., 1987) e fosfoenol piruvato carboxiquinase (Hason et al., 1997). Em contraste a essas atividades dependentes da ligação direta ao DNA, GR também regula a expressão gênica por interagir com outros fatores de transcrição como NF-κB,

AP-1 (Heck et al., 1997), NF-AT (Vacca et al., 1992), CREB (Imai et al., 1993) e Stat5 (Stoecklin et al., 1997), gerando antagonismo transcricional ou, em alguns casos, sinergismo.

Além dos efeitos estabelecidos na transcrição, evidências crescentes demonstram que GR também exerce papel nas vias de sinalização citosólica, incluindo a ativação de IP3-quinase (Limbourg et al., 2002). Têm sido demonstradas múltiplas isoformas de domínios N-terminal geradas a partir de diferentes mecanismos de transdução de GR (Lu & Cidlowski, 2001). Essas isoformas, juntamente aos distintos promotores de GR já caracterizados, parecem regular diferentes tipos de genes, com funções imunorregulatórias distintas, refletindo o amplo espectro de ações que GC exercem no sistema imune (Zhou et al., 2005).

#### **1.4.1.2. Mecanismos moleculares e celulares da apoptose induzida por GC em células T: efeitos genômicos e não-genômicos**

Durante os últimos anos, algumas técnicas para a identificação dos efeitos genômicos induzidos por GC têm sido desenvolvidas, embora poucos candidatos tenham sido identificados. A análise em larga-escala da expressão de genes regulados por GC só foi realizada em linhagens celulares. Genes descritos em serem supra ou infrarregulados incluem c-myc (Forsthoefel & Thompson, 1987), ttag8 (Tosa et al., 2003), dig2 (Wang et al., 2003 a), Bim (Wang et al., 2003 b) e PUMA (How et al., 2001).

Muitos experimentos têm incluído fatores anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2 na apoptose induzida por GC. Camundongos reconstituídos com células de fígado fetal murino obtidas a partir de animais transgênicos para Bcl-2 são protegidos da morte celular induzida por GC (Bouillet et al., 1999; Marsden et al., 2002), bem como células de linfoma murino que superexpressam Bcl-2 (Memon et al., 1995; Huang & Cidlowski, 2002). Estudos realizados em células T de hibridoma murino sugerem que a superexpressão de Bcl-2 também bloqueia a liberação de citocromo c em resposta a GC (Susin et al., 1999). A importância de Bcl-2 tem sido investigada em camundongos deficientes para essa proteína, que apresentam apoptose linfóide fulminante *in vivo* e aumento da morte celular de timócitos *in vitro* após tratamento com GC (Kaufmann et al., 2003). Juntos, esses dados indicam que o nível de Bcl-2 determina a

sensibilidade à GC. Uma vez que é sabido que Bcl-2 se localiza e atua tanto na mitocôndria quanto no retículo endoplasmático, ambas as organelas provavelmente exercem importante função na apoptose induzida por GC (Kaufmann et al., 2003).

O papel de Bcl-x nessa função não está claro. Sabe-se que esta proteína é redistribuída na mitocôndria após tratamento com GC, o que pode ser prevenido por inibidores de transdução (Hsu et al., 1997; Jia et al., 1999). A superexpressão de Bcl-xl em uma linhagem de hibridoma de célula T bloqueia a apoptose induzida por GC (Memon et al., 1995) e uma constante expressão de Bcl-xl é um pré-requisito para a resistência de timócitos simples-positivos à apoptose induzida por GC *in vivo* (Brandt et al., 2004). Dessa forma, Bcl-xl contribui para a sensibilidade de linfócitos à apoptose induzida por GC, embora isso pareça estar restrito a estágios específicos de desenvolvimento de células T.

A função dos membros “*multi-domain*” Bax e Bak tem sido investigada através de técnicas de interferência gênica. Enquanto timócitos de camundongos deficientes para somente uma dessas proteínas não demonstram diferença quanto à sensibilidade à morte induzida por GC, na ausência de ambas as moléculas, os timócitos tornam-se completamente resistentes (Lindsten et al., 1989; Wei et al., 2001). Isso sugere que Bax e Bak estejam envolvidos no efeito de GC, embora pouco seja sabido como isso ocorre. Possivelmente GC, através de proteínas “*BH3-only*”, como Bim, leva à alteração conformacional dessas proteínas pró-apoptóticas, o que gera desestabilização da membrana mitocondrial. Supõe-se atualmente que diferentes membros da família “*BH3-only*” sejam responsáveis por mediar resposta a diferentes estímulos pró-apoptóticos (Marsden et al., 2001). Bid, por exemplo, é conhecido pelo seu envolvimento na morte mediada por Fas em certos tipos celulares (Yin, 2000). A morte de timócitos induzida por GC não foi afetada em camundongos deficientes para Bid, excluindo um papel fundamental dessa molécula na morte induzida por GC (Yin et al., 1999). A função de Bad tem sido investigada em camundongos transgênicos para essa proteína especificamente em células T. A superexpressão de Bad sensibiliza os timócitos à morte induzida por GC. Entretanto, isso pode simplesmente refletir seu efeito antagonista na atividade repressora de morte por Bcl-xl e,

portanto, Bad não estaria envolvida nesse processo em circunstâncias normais (Mok et al., 1999). Como mencionado anteriormente, a proteína Bim tem sido identificada como suprarregulada durante a apoptose induzida por GC em linhagens de linfomas de células T (Wang et al., 2003 b). De acordo com essas observações, linhagens celulares pré-B que passaram a expressar níveis reduzidos de Bim pela técnica de RNAi, tornaram-se parcialmente resistentes à morte induzida por GC (Abrams et al., 2004), o que também foi demonstrado *in vivo* em animais deficientes para essa proteína, quando comparados a camundongos normais (Bouillet et al., 1999, Marsden et al., 2002). Timócitos obtidos de camundongos deficientes para PUMA apresentam resistência à morte induzida por GC (How et al., 2001).. Nesse contexto, também demonstrou-se aumento de PUMA em resposta ao tratamento por GC (Jeffers et al., 2003; Villunger et al., 2003).

Embora esses dados sugiram que o início da morte celular por GC esteja relacionado à expressão gênica *de novo*, é interessante notar que alguns eventos possam também envolver ações denominadas não-genômicas de GC. Essas incluem geração de ROS, ativação de fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) e mobilização transiente de  $Ca^{++}$ , ativação de esfingomielinase ácida com conseqüente aumento da geração de ceramida e liberação lisossomal de catepsina B (Doolan et al., 1998; Long et al., 2008). Nesse contexto, tem sido demonstrado através de inibidores de Src e Cdk2, que a ativação dessas quinases é fundamental para a sensibilidade induzida por GC (Hakem et al., 1999). Outros efeitos não-genômicos de GC são mediados por formas membranares de GR expressas em um número limitado de células hematopoiéticas como monócitos e linfoma de célula TS 49 (Bartholome et al., 1994). GC induz instantânea translocação de GR para a mitocôndria em células T sensíveis a GC, mas não nas resistentes, o que sugere que níveis elevados de GR na mitocôndria sejam fundamentais para o início da apoptose (Sionov et al., 2006). Além disso, a elevada sensibilidade de timócitos DP, que apresentam baixa expressão de GR (Wieggers et al., 2001) pode refletir ações não-genômicas de GC no timo durante o processo de seleção.

É importante ressaltar que embora esses efeitos não-genômicos estejam sendo apontados como importantes componentes para o processo de apoptose



induzida por GC, é fundamental que ocorra formação dos produtos protéicos relacionados à transativação mediada por GR como as proteínas Bax e Bad, além da ligação de GR ao DNA, como demonstrado em animais deficientes para essa ligação e cujos timócitos são resistentes à indução de morte por GC (Cole et al., 2001).

#### **1.4.1.3. Produção intratímica de glicocorticóides**

A produção intratímica de GC já foi caracterizada através de diferentes abordagens experimentais. A presença da maquinaria biossintética necessária já foi demonstrada em diferentes compartimentos do timo (Vacchio et al., 1994). Timócitos expressam genes que codificam para todas as enzimas requeridas para a síntese *de novo* de GC e produz o hormônio ativo, como demonstrado por ensaios com genes repórteres específicos pra GC e quantificação por ELISA (Qiao et al., 2008). A produção desse hormônio parece ser restrita à DP, sem associação à expressão de CD69, um marcador de seleção positiva (Qiao et al., 2008). Nesse mesmo estudo observou-se que GC derivados de timócitos apresentam efeito anti proliferativo em linhagens celulares transfectadas com GR.

Além de timócitos, diversas análises já demonstraram a produção intratímica de GC por TEC. Células epiteliais tímicas convertem precursores de GC em deoxicorticosterona *in vitro*, além de produzirem metabólitos com capacidade de ativação da transcrição dependente de GR (Pazirandeh et al., 1999; Lechner et al., 2000). Em modelo de cultivo organotípico de timo fetal (FTOC), a inibição da síntese de GC por metirapona influencia na apoptose, sugerindo que hormônios esteróides sejam de fato produzidos no timo (Vacchio et al., 1994). Paralelamente foi demonstrado que metirapona influencia o desenvolvimento de timócitos independentemente da presença ou ausência de GR funcional, indicando que essa droga inibe o desenvolvimento de timócitos de forma inespecífica (Purton et al., 2006). Nesse contexto, um novo modelo de camundongo transgênico no qual a superexpressão de GR em timócitos foi controlada por um sistema induzido por tetraciclina foi demonstrado recentemente. Nesse modelo, animais com ausência de GC derivado da adrenal apresentaram diminuição na celularidade tímica frente à superexpressão de GR (Pazirandeh et al., 2005). Corrobora com esses dados o

achado de que a aplicação do antagonista de GR RU486 gera aumento da celularidade tímica mesmo em camundongos adrenalectomizados, o que ressalta a evidência para um papel de GC de origem extra-adrenal (Perez et al., 2007). Outros estudos, entretanto, argumentam contra essa hipótese. Em ratos transgênicos adrenalectomizados, que superexpressam uma forma mutante de GR com maior afinidade de ligação, a celularidade tímica é restabelecida após 3 semanas da retirada das adrenais (Pruett & Padgett, 2004).

Já está caracterizado o papel de GC produzidos localmente na atrofia tímica senil. A síntese de GC em timócitos, bem como a expressão das enzimas limitantes StAR e CYP11A1, aumentam com a idade, ao mesmo tempo em que ocorre diminuição da produção em TEC (Qiao et al., 2008). Essa mudança da síntese de GC em diferentes compartimentos tímicos durante a atrofia senil reflete funções diferentes do hormônio durante o desenvolvimento de células T.

A função de GC no timo é controversa, e estudos utilizando diferentes linhagens de camundongos geneticamente modificados, com ausência ou superexpressão de GR, não geraram um consenso nessa área. O que parece é que GC possa exercer efeitos negativos ou positivos sobre timócitos, dependendo do estado de diferenciação, da concentração local de GC e do microambiente envolvido.

#### ***1.4.1.4. Variação da suscetibilidade de timócitos à morte celular induzida por glicocorticóides***

Já é reconhecido há mais de 20 anos que timócitos diferem na sensibilidade ao tratamento por GC dependendo do estágio de desenvolvimento. Quando administrado em doses farmacológicas, timócitos DP sofrem morte celular *in vivo* enquanto as células SP CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são resistentes a GC (Triglia & Rothenberg, 1981; Oldenburg et al., 1998). Uma das explicações para isso envolveria a proteção mediada por CD28 em timócitos SP. A expressão dessa molécula em ratos e humanos aumenta durante o desenvolvimento de timócitos e seus principais ligantes, B7-1/CD80 e B7-2/CD86, são exclusivamente expressos por células da medula tímica, onde estão localizadas as células maduras (Palmer, 2003). Embora refratários à

morte induzida por GC *in vivo*, timócitos SP se tornam sensibilizados quando em cultura. Entretanto, o aumento da sinalização de CD28 na ausência de ativação de TCR restaura sua resistência ao tratamento por GC, provavelmente por aumentar Bcl-xl (Boise et al., 1995). Esse modelo é consistente com achados anteriores de que proteínas anti apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xl são reguladas durante o desenvolvimento de timócitos (Moore et al., 1994). Similarmente, timócitos SP de camundongos que não expressam CD28 demonstram sensibilidade aumentada à administração de GC *in vitro* (van den Brandt et al., 2005), o que reforça a hipótese da importância da expressão dessa molécula para a resistência frente à GC.

A sensibilidade diferencial entre timócitos maduros e imaturos, à apoptose induzida por GC, forma a base para a suposta participação desse hormônio nos processos de seleção positiva e negativa, conforme descrito a seguir.

#### **1.4.1.5. Participação de glicocorticóides no desenvolvimento de células T**

Um ponto importante no desenvolvimento de células T ocorre no estágio de DP, quando a interação entre TCR e o complexo MHC-peptídeo expresso por células do microambiente inicia o processo de seleção que leva à morte por negligência ou por seleção negativa. Como já revisado, nesse estágio a maioria dos timócitos DP morre devido à ineficiência em interagir com ligantes próprios no contexto de MHC. De acordo com o modelo de avidéz, células DP com TCR que interagem com afinidade moderada a ligantes próprios seriam positivamente selecionadas e amadureceriam em células T funcionais. Interações de alta afinidade com MHC próprio, o que seria equivalente a autorreatividade na periferia, leva as DP à apoptose, resultando em seleção negativa. Muitos modelos de seleção negativa e positiva determinam que a força de sinalização do TCR define o destino do timócito. No modelo de antagonismo mútuo isso estaria associado a uma interface entre apoptose induzida por TCR e GC (Vacchio et al., 1999). Separados, a sinalização através de TCR e GR induz apoptose, mas quando ambos os receptores são coordenadamente estimulados eles se opõem. Assim como quando estimuladas por GC, a ativação de células T gera bloqueio do ciclo e indução de morte celular programada, o que está associado à expressão de RNAm e

síntese *de novo* de proteínas. Especulava-se que a ação conjunta dos dois fatores poderia gerar morte celular de forma aditiva (nesse caso pela mesma via) ou sinérgica (implicando diferentes vias). Entretanto, o que se tem observado através de diferentes abordagens experimentais é que células expostas a GC em presença de ligante TCR sobrevivem (D' Adamio et al., 1997; Zhan et al., 2004). De fato, é sabido que a morte induzida por ativação de células T ocorre devido à suprarregulação de ligante Fas, fenômeno esse inibido por GC como consequência de uma interferência transativacional de GR-ligante com outros fatores de transcrição, como AP-1 (Baumann et al., 2005).

A ativação de timócitos é sempre inibida por GC. No caso de células com avidéz intermediária isso levaria à inibição da expressão de produtos gênicos que desencadeariam apoptose e assim permitiriam a continuidade do processo de diferenciação. Em timócitos com baixa avidéz, glicocorticóides inibiriam a expressão de produtos gênicos necessários para a diferenciação. Nesse sentido, é especulado que GC de origem intratímica exerçam papel fundamental na diferenciação de células T (Vacchio et al., 1994; Qiao et al., 2008). Em condições nas quais timócitos com baixa avidéz para MHC-peptídeo próprio seriam deletados por negligência durante a seleção positiva, a inibição da produção local de corticosterona aumentou a recuperação dessas células. Por outro lado, em animais adrenalectomizados, a produção local de GC não mantém a geração de um repertório de células T funcionais (Stojić-Vukanić et al., 2009). Foi observado nesse modelo aumento de DP com baixa expressão de TCR e seus precursores juntamente à diminuição dos estágios mais maduros de DP e SP TCR<sup>high</sup>, indicando a importância de GC produzido pela adrenal na diferenciação de células T. A hipótese de antagonismo mútuo é consistente com uma variedade de observações. A inibição da produção de GC em modelo FTOC torna os timócitos DP extremamente sensíveis à deleção mediada por TCR, enquanto a ausência de corticosteróides derivados da adrenal resulta em deleção mediada por TCR de células que de outra forma sobreviveriam à seleção negativa por apresentarem TCR com avidéz moderada (Vacchio et al., 1999). A análise em camundongos que não expressam GR intratímico funcional revelou um repertório de células T alterado, com perfil de baixa afinidade de interação com MHC-peptídeo próprio e redução do potencial

autorreativo. Em contraste, estudos realizados em diferentes linhagens de camundongos deficientes na expressão de GR falharam em confirmar estes dados, embora na grande maioria não tenha sido verificado repertório TCR (Purton et al., 2000; Purton et al., 2002).

Seja como for, o que parece é que o efeito intratímico de GC é análogo ao da periferia, atuando como imunossuppressores por prevenirem a expressão de genes induzidos por ativação. No caso da periferia essa atividade resulta em inibição da função efetora. No caso de tímócitos determinaria o limiar de avidéz na interação MHC-TCR capaz de induzir seleção positiva.

#### **1.4.1.6. Prolactina: síntese, expressão e sinalização**

Inicialmente a prolactina foi caracterizada como um hormônio lactotrófico secretado pela hipófise. Composta por um único polipeptídeo que em ovinos pesa 23-kDa e possui 198 resíduos de aminoácidos, apresenta duas pontes dissulfídicas e apenas um resíduo de triptofano, características essas que compartilha com outros hormônios, como GH, com o qual apresenta homologia de 35% (Niall et al., 1971; Miller & Eberhardt, 1983). A PRL sintetizada na hipófise está sob constante controle de circuitos neurais, sendo a dopamina o principal neurotransmissor relacionado à inibição tônica da liberação desse hormônio (MacLeod & Lehmeyer, 1974). Uma vez secretada pela adeno-hipófise, a PRL é transportada via circulação, agindo nas células-alvo através de receptores de membrana, através dos quais desencadeia uma série de eventos próprios, como a lactação. Além dessa ação hormonal clássica, a PRL também é sintetizada e secretada por muitos tecidos extra-hipofisários podendo agir localmente em células adjacentes (efeito parácrino) ou nas próprias células secretoras (efeito autócrino) sem afetar a concentração circulante do hormônio (Hooghe et al., 1993, Bernichtein et al., 2010). Já foram descritos mais de 300 efeitos em vertebrados (Bole-Feysot et al., 1998). A expressão do gene da PRL, assim como do seu receptor, tem sido registrada em vários outros sítios além da hipófise, tais como cérebro, miométrio, glândula lacrimal, timo, baço, células epiteliais mamárias, fibroblastos, linfócitos circulante e células linfoides da medula óssea, entre outros (Corbacho et al., 2004). A composição da proteína final da PRL extra-hipofisária é idêntica à da hipofisária e ambas compartilham um mesmo gene. Porém, os RNA

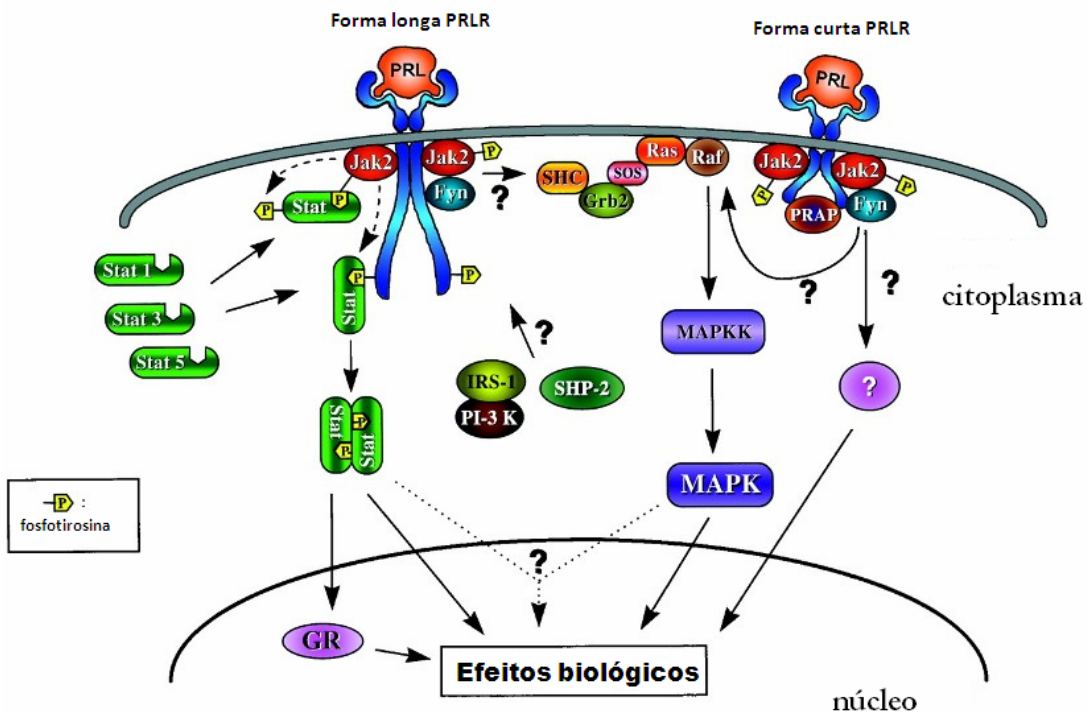
mensageiros e as regiões promotoras são distintas, assim como o controle de sua transcrição (Gellersen et al., 1995). A PRL hipofisária é transcrita a partir da ativação de um promotor proximal, cujo principal ativador é o estrógeno e o principal inibidor é a dopamina (MacLeod & Lehmeyer, 1974, Lieberman et al., 1978, Gudelsky et al., 1981). Já a transcrição da PRL extra-hipofisária é controlada por um promotor superdistal (Berwaer et al., 1994). Além disso, a expressão da PRL extra-hipofisária é célula-específica e independente de Pit-1, um importante fator de transcrição dos genes de PRL, GH e TSH (Gellersen et al., 1995).

Em 1991, Nagy e Berczi relataram que ratas hipofisectomizadas permaneciam com 10% a 20% da atividade lactogênica. Dentro de dois meses, essa atividade gradualmente aumentou para 50%. Nos animais submetidos à imunoneutralização da PRL houve redução importante da atividade lactogênica, causando deficiências imunológicas múltiplas e morte. Esses achados não ocorreram no grupo de ratas hipofisectomizadas sem imunoneutralização. Por esses resultados, os autores sugeriram que a PRL estivesse envolvida em funções vitais, provavelmente mantidas pela sua produção extra-hipofisária.

Independente da origem, PRL tem sua atividade mediada pelo seu receptor, PRLR, expresso em muitos tipos celulares (Bole-Feysot et al., 1998; Corbacho et al., 2004). Membro da “superfamília hematopoiética-citocina”, que inclui também os receptores de interferon e de inúmeras interleucinas, a sinalização mediada por esse receptor está envolvida nas respostas de crescimento e diferenciação de linhagens hematopoiéticas (Shields et al., 1995). Receptores desta família têm algumas características estruturais comuns concentradas na porção extracitoplasmática (extremidade amino-terminal), região de maior homologia entre eles. Compostos por apenas um peptídeo, apresentam dois pares de resíduos cisteína que formam entre si pontes dissulfeto (Wells et al., 1996). A semelhança do PRLR com GHR origina uma superposição das funções desses hormônios, como é o caso da PRL com GH murinos. A afinidade, naturalmente, é preferencial pelo receptor específico. A PRL ovina e o GH ovino apresentam especificidade pelos respectivos receptores no camundongo e por isso são os hormônios mais usados para o estudo de seus efeitos (Murphy et al., 1988; Rynikova et al., 1988). Existem

muitas formas de PRLR, resultantes de splicing alternativo de um mesmo RNAm, que incluem a forma longa (85-90kDa) e curta (42kDa), com efeitos biológicos distintos (Horseman 2002, Corbacho et al., 2004). Uma forma intermediária (65kDa) ocorre naturalmente em linfoma de célula T de ratos Nb2 (Kline et al., 1999). Todos os receptores possuem regiões extracitoplasmáticas idênticas, diferindo na porção citoplasmática.

Uma molécula de PRL liga-se a duas do seu receptor, causando a dimerização do mesmo. Isso resulta na subsequente ativação de quinases associadas (Bole-Feysot, 1998). Muitos estudos de sinalização têm focado na via de sinalização JAK-STAT, utilizada por todos os receptores de citocinas hematopoiéticas, ou citocinas tipo 1. Nesse contexto, a ativação de JAK2 (do Inglês, "*Janus kinase*" tipo 2) que fosforila o receptor e se autofosforila em múltiplos resíduos de tirosinas, é o passo inicial na cascata de sinalização. As tirosinas fosforiladas no complexo receptor-JAK2 formam sítios de ligação para diversas proteínas sinalizadoras, destacando-se entre essas STAT 1 a 5 (do Inglês, "*Signal transducers and activators of transcription*", tipos 1 a 5). Após a ligação ao complexo receptor-JAK2, as STAT são fosforiladas pela JAK2. Posteriormente, as STAT-P se separam do complexo e se homodimerizam ou heterodimerizam com outras STAT-P, movendo-se para o núcleo e ativando, assim, a transcrição gênica (Figura 1.4). Uma vez que todos os componentes da via JAK-STAT pré-existem no citoplasma, a sinalização de PRLR é iniciada de 1-5 minutos, através de uma série de eventos de fosforilação. Dentro de 5-10 minutos, são detectados no núcleo transcritos de genes alvos induzidos por PRL (Rui et al., 1998). É fundamental que a desativação do sistema JAK-STAT ocorra no momento preciso, pois a ativação constitutiva desse sistema está associada à transformação celular. Isso ocorre por meio da degradação dos receptores, da defosforilação das tirosinas presentes nos complexos receptores-JAK2 e através da indução de síntese da proteína inibitória SOCS (do inglês, "*Supressors of cytokine signaling*") (Pezet et al., 1999).



**Figura 1.4. Representação esquemática das vias de sinalização acopladas ao receptor de prolactina (PRLR).** As formas longa e curta de PRLR estão representadas. PRLR ativa Stat1, Stat 3 e principalmente Stat5. Interações de Stat5 com o receptor de glicocorticóide (GR) já forma descritas. Não é sabido ao certo se a isoforma curta de PRLR ativa a via de Stat. PRAP (proteína associada a PRLR) parece interagir preferencialmente com a forma curta de PRLR. A via de MAP quinase envolve a cascata de Shc, Grb2, Sos e Ras e é ativada por ambas as isoformas de PRLR. Conexões entre as vias JAK-Stat e MAPK têm sido sugeridas. Interações entre os receptores e as quinases Src (por exemplo, Fyn), SHP2, IRS-1, PI-3 quinase e outras moléculas de tradução permanecem em questão. (Adaptado de Bole-Feysot, 1998.)

A ativação de JAK2 por PRL ativa principalmente STAT5A e STAT5B e em menor extensão STAT1 e STAT3. As proteínas STAT são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes, compostos de 750-800 resíduos de aminoácidos. Apresentam domínios funcionais conservados e um resíduo crítico de tirosina SH2, importante para a dimerização, translocação nuclear e ligação ao DNA. Modificações adicionais pós-traducionais contribuem para a habilidade dos fatores STAT em regular a transcrição gênica (Shuai & Liu, 2003). O potencial de transativação de STAT é modulado não só pelas interações dos complexos ativados de STAT com proteínas nucleares, como fator de regulação do Interferon 1 (IRF-1), c-jun, Sp1, Src e receptores nucleares de hormônio (Yo-Lee, 2002; de Miguel et al., 2003), como também por interações com diversos co-ativadores (Chatterjee-Kishore et al., 2000).



Interações desse tipo não só facilitam a ação de fatores de transcrição sobre componentes da maquinaria de transcrição basal, mas também geram, através da atividade intrínseca de histona-acetiltransferase, remodelamento de cromatina, permitindo o acesso de tais fatores à região promotora dos genes. As proteínas STAT podem agir como ativadores ou repressores transcripcionais dependendo do promotor em questão, da concentração disponível de coativadores e co-repressores, da presença de outras proteínas de ligação ao DNA ou do estágio de diferenciação da célula em questão. Em camundongos deficientes para STAT5A/B, a expressão de alguns genes alvos de STAT5 está elevada (Akira, 1999). Se STAT5 está agindo diretamente ou através de fatores repressores induzíveis, ainda não se sabe ao certo.

Evidências crescentes apontam a PRL como um importante fator de regulação do sistema imune. Secretada pela maioria das células desse sistema, estimula a proliferação, diferenciação e maturação de linfócitos T, amplificando a ação de IL-2 e promovendo a inibição de apoptose nessas células, conforme já mencionado anteriormente (Chavez-Rueda et al., 2005). Adicionalmente existem diversas evidências da participação da PRL na fisiopatologia de doenças autoimunes (Jara et al., 1991; Krishnan et al., 2003). Em contrapartida, o papel fundamental da PRL no sistema imune não foi confirmado nos estudos com camundongos com ausência para PRLR, nos quais não houve qualquer imunodeficiência (Horseman et al., 1997; Bouchard et al., 1999).

Apesar disso, e embora ainda existam controvérsias relacionadas ao requerimento absoluto desse hormônio na função imune, PRL tem sido indicada como um importante fator imunomodulador em condições de estresse (Stöcklin, 1996; Bole-Feysot, 1998.; Engblom, 2007). A hipótese prevalente é que durante o estresse, PRL contrabalanceie o efeito imunossupressor de GC e outros mediadores inflamatórios, permitindo a manutenção do estado de homeostasia (Figura 1.4.). Essa hipótese é sustentada por estudos *in vivo* que demonstram efeito protetor de PRL após trauma hemorrágico, queimaduras, administração de glicocorticóide e um efeito regulatório de PRL na produção de mediadores inflamatórios (Majumder et al., 2002). Durante a resposta de fase aguda, a ação de PRL parece estar suprimida (Corbacho et al., 2004), embora nesse contexto a participação de PRL e seu receptor ainda não esteja

completamente caracterizada. Especula-se que o “*cross-talk*” negativo entre STAT5 e NFkB, Smad e GR poderia explicar, em parte, como PRL antagoniza a sinalização de TNF, TGF- $\beta$  e GC, respectivamente, nos genes alvo (Bole-Feysot, 1998.; Engblom, 2007).

De qualquer forma, ambos GC e PRL são ditos hormônios de estresse e muitas das ações do estresse sobre o sistema imune vêm sendo creditadas ao balanço entre esses dois hormônios, os quais apresentam uma série de ações antagônicas.

### **1.5. Alterações neuroimunoendócrinas durante a infecção por *T. cruzi***

A doença de Chagas é uma das doenças parasitárias mais frequentes na América Latina, havendo milhões de indivíduos infectados (Dias et al., 2002). Causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é transmitida a humanos e outros mamíferos de forma indireta, através de um inseto hematófago. O modelo murino utilizado para reprodução experimental dessa patologia apresenta algumas semelhanças à manifestação da doença em humanos, se dividindo em uma fase aguda, que ocorre logo após a infecção e uma fase crônica, que se desenvolve em período mais tardio (Marinho et al., 1999). O estágio agudo é caracterizado pela existência de formas tripomastigotas circulantes e ninhos de amastigotas no tecido alvo (Parada et al., 1999), enquanto no estágio crônico poucos parasitos circulantes ou teciduais são detectados, embora ocorra uma miocardite progressiva que pode cursar ou não com a forma digestiva da doença, caracterizada por comprometimento de cólon e esôfago (Matsuda et al., 2009).

Durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* ocorre comprometimento do balanço neuroimunoendócrino, caracterizado por alterações endócrinas manifestadas em paralelo à mudança no perfil de citocinas (Perez et al., 2007). Embora este ainda seja um assunto pouco estudado, muitos aspectos do desenvolvimento da fisiopatologia observada estão relacionados à perturbação na homeostasia de ambos os sistemas que interagem, o que permite ao indivíduo infectado montar uma resposta protetora contra o agente, mas que muitas vezes acaba sendo deletéria (Roggero et al., 2006). Nesse sentido, diversas citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a infecção por *T. cruzi* estimulam a atividade fagocitária seguida de destruição do agente invasor, ao

mesmo tempo que ativam o eixo HPA, com a elevação dos níveis de GC sistêmicos que acabam, através de uma alça contraregualtória, modulando as níveis dessas citocinas (Brener & Gazzinelli, 1999; Perez et al., 2007).

A miocardite chagásica, seja na fase aguda ou crônica, é característica de uma exarcebada resposta pró-inflamatória de perfil Th1. A infecção em animais adrenalectomizados e tratados com o antagonista de GR, RU486, leva a uma expressão elevada dos níveis de TNF- $\alpha$ , o que resulta em morte do indivíduo (Andrade, 1999, da Matta Guedes et al., 2011). Dessa forma, parece claro que a ativação do eixo HPA durante a inflamação é um importante mecanismo de defesa, por limitar o dano ao hospedeiro causado pela exarcebação da resposta imune contra o agente. A explicação para a importância desse equilíbrio imunoendócrino está no fato de que GC exercem uma resposta imunossupressora, do tipo Th2, e que inibe a imunidade celular de perfil Th1, que gera dano tecidual. Além disso, existem evidências de que essa resposta diminui a chance de indução de autoimunidade (Wensky et al., 2001). Muitos epítomos expressos pelo parasito se assemelham a antígenos teciduais do hospedeiro. Assim, durante a resposta policlonal característica da infecção, ocorre síntese de anticorpos contra o parasita, que apresentam reatividade contra antígenos próprios do hospedeiro (Kierszenbaum, 2005). Nesse contexto, a imunossupressão relacionada a GC limita a exacerbação deste tipo de resposta, de característica autoimune.

Por outro lado, a ação excessiva de GC tem efeitos deletérios ao indivíduo, como o comprometimento do timo (Leite-de-Moraes et al., 1991, Savino., 2006; Perez et al., 2007). Uma vez que há necessidade da constante reposição de células T periféricas, a preservação do timo durante a infecção por *T. cruzi* é importante no desenvolvimento de uma resposta imune contra o hospedeiro. Além disso, considerando a importante função do timo na geração de tolerância central durante a timopoiese, através dos eventos de seleção intratímica e formação de células T reguladoras, a manutenção da integridade desse órgão estaria também relacionada à prevenção de autoimunidade. A mudança na expressão de moléculas de ECM no timo, durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, está relacionada à alteração no perfil de migração intratímica e liberação de tímócitos imaturos para a periferia de sistema imune,

o que poderia favorecer a geração da resposta autoimune relacionada (Savino et al., 2006).

Por outro lado, o aumento dos níveis circulantes de GC durante a infecção por *T. cruzi* está relacionado à indução de apoptose de timócitos DP (Leite de Moraes et al., 1991, Savino., 2006; Perez et al., 2007), um dos principais fatores envolvidos na atrofia tímica característica da fase aguda da infecção. No entanto, é importante notar que, embora muitos dos efeitos sistêmicos de GC já tenham sido identificados, o papel de GC produzido localmente em tais alterações ainda permanece desconhecido.

Pouco se sabe sobre a participação PRL na fisiopatologia da doença de Chagas. Uma vez que antígenos do parasito são encontrados na adenohipófise, juntamente à presença de um infiltrado inflamatório, é provável que haja comprometimento da função secretora glandular (Correa-de-Santana et al., 2006). De fato, já foi demonstrado pelo nosso grupo diminuição da expressão de PRL na hipófise juntamente à redução da atividade transcricional de Pit-1 (Correa-de-Santana et al., 2009). Considerando que PRL é uma substância imunomoduladora capaz de reverter muitos dos efeitos imunossupressores de GC, e ainda que existe uma grande expressão da principal isoforma de seu receptor no timo, é provável que alterações nos circuitos intratímicos de GC e PRL estejam envolvidas na atrofia tímica induzida por *T. cruzi*. O presente trabalho foi desenvolvido com base em uma série de abordagens experimentais voltadas para elucidar essa questão.

## **2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO E OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL:**

Uma vez que a atrofia tímica característica da infecção experimental por *T. cruzi* ocorre principalmente devido à ação pró-apoptótica de GC sobre timócitos imaturos DP, pretendemos investigar uma provável participação de PRL, um outro hormônio de estresse que contrabalança muitos dos efeitos imunossupressores de GC, durante esse fenômeno.

Dando continuidade a trabalhos realizados pelo nosso grupo, que demonstram modulação da síntese de PRL frente à infecção experimental por *T. cruzi*, pretendemos na presente dissertação de mestrado avaliar um possível envolvimento dos circuitos intratímicos de PRL e GC na atrofia tímica característica da fase aguda dessa infecção.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Através de diversos experimentos envolvendo abordagens celulares e moleculares, pretendemos:

- 1) Caracterizar o perfil da atrofia tímica em diferentes dias da cinética de infecção aguda pelo *T. cruzi*;
- 2) Verificar se existe relação entre a produção sistêmica e a produção intratímica de GC e PRL;
- 3) Analisar se a atrofia tímica decorrente da infecção cursa com modulação local de GR, PRLR e seus ligantes;
- 4) Verificar uma possível função cruzada (*cross-talk*) entre GR e PRLR relacionada à apoptose de timócitos que ocorre durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais e infecção pelo *Trypanosoma cruzi***

Camundongos machos da linhagem BALB/c com idade entre 6-8 semanas foram obtidos do biotério central da Fundação Oswaldo Cruz e utilizados nas diferentes abordagens experimentais a seguir relacionadas. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Experimentação e Utilização de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz.

O procedimento de infecção por *T. cruzi* consistiu na inoculação intraperitoneal de  $10^2$  formas tripomastigotas da cepa Tulahuén derivadas de co-cultivo com células da linhagem Vero (isolada a partir de rim de macaco verde africano). Nas diversas abordagens experimentais, os camundongos foram infectados em dias diferentes, de forma a podermos obter simultaneamente as amostras de todos os grupos infectados. Em todos os casos os animais foram eutanasiados em câmaras de CO<sub>2</sub> e a eficiência da infecção verificada por paresitemia.

#### **3.2. Caracterização fenotípica das subpopulações de timócitos**

A análise do fenótipo de diferentes subpopulações de timócitos foi realizada por citometria de fluxo em placas de fundo em V, na concentração de  $10^6$  células/poço após contagem de células viáveis em câmara de Neubauer por exclusão com azul de Tripán. Para caracterização das diferentes subpopulações timocitárias, as células foram incubadas com 10 µl de anticorpos monoclonais anti CD4 e anti CD8 conjugados a diferentes fluorocromos, a 4°C por 30 minutos. Para a verificação de morte celular por apoptose as células foram lavadas em tampão apropriado e, após 15 minutos, marcadas com anexina V-FITC. As amostras foram então adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson, San Diego, USA) equipado com o programa CellQuest. Para posterior análise, foi utilizado o software Summit 4.32 (Dako Cytomation). Em alguns experimentos, realizamos análise conjunta de anexina V com PI; observamos que a contribuição de necrose corresponde a valores < 15%.

#### **3.3. Verificação de Expressão Gênica por PCR em tempo real**

##### **3.3.1. Obtenção das amostras**

Timócitos de fenótipos DP, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram isolados pela técnica de enriquecimento celular. Para isso, timos obtidos de animais não-infectados e infectados com 8 ou 14 dias pós-infecção (dpi) foram macerados em homogeneizador de tecidos (potter) e os linfócitos contados em câmara de Neubauer, sendo a seguir agrupados em *pools* de timócitos formados por 4 timos de cada condição experimental. Após caracterização fenotípica, as diferentes subpopulações foram purificadas utilizando-se o aparelho MoFlow (DakoCytomation, Fort Collins, CO). Para garantir a pureza das amostras, realizou-se exclusão das subpopulações não desejadas por seleção negativa e posterior verificação do perfil CD4/CD8. A seguir, as amostras obtidas foram centrifugadas, ressuspendidas em RNAlater (Applied Biosystems, USA) e conservadas a -20°C até o momento da extração de RNA.

Timos obtidos de animais não-infectados e com 6 e 8 dpi foram triturados em homogeneizador de tecido juntamente com a solução de tiocianato de guanidina, um potente inibidor de RNAses e, a seguir, submetido à sonicação durante 30 minutos para lise completa das células. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante estocado em freezer -80°C até o momento da extração de RNA.

O RNA total das diferentes subpopulações de células enriquecidas foi extraído utilizando-se o RNeasy Micro Kit (Qiagen, USA) e quantificado no Nanodrop (Thermo Scientific, USA). A partir de amostras equivalentes em 1µg de RNA, sintetizamos cDNA utilizando-se SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA), na presença de primer randômico, de acordo com a recomendação do fabricante.

### **3.3.2. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)**

Para realizarmos as análises de expressão gênica por PCR em tempo real, utilizamos amostras de 100 ng de cDNA diluídas em Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), no sistema ABI PRISM 7500 FAST RealTime PCR System (Applied Biosystems, USA). O qPCR foi realizado a 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min. A expressão constitutiva de GAPDH foi utilizada para verificar a uniformidade das amostras utilizadas. A especificidade dos produtos do PCR foi analisada através da curva de dissociação. Os dados foram analisados por ABI Prism

SDS v1.3.1 “software”. Todos os primers foram desenhados utilizando-se Primer Express 3.0 specific for 7500 FAST Real Time PCR System: CYP11A1 - *forward primer* 5'-GACCTGGAAGGACCATGCA-3' e *reverse primer* 5'-TGGG TGTACTCATCAGCTTTATTGA-3'; StAR - *forward primer* 5'-TCACTTGGCTGC TCAGTATTGAC-3' e *reverse primer* 5'-GCGATAGGACCTGGTTGATGA-3; 11 $\beta$ -HSD1 - *forward primer* 5'-TGGTGCTCTTCCTGGCCTACT-3' e *reverse primer* 5'-CTGGCCCCAGTGACAATCA-3'; 11 $\beta$ -HSD2 - *forward primer* 5'-CCGTGTT CTGGAAATCACCAA-3' e *reverse primer* 5'-AATATTGAGGCCAGCGTTGTTA A-3'; GR - *forward primer* 5'-CAAGTGATTGCCGCAGTGAA-3' e *reverse primer* 5'-CATCCAGGTGTAAGTTTCTGAATCC-3'; PRL - *forward primer* 5'-GGGTCA GCCCAGAAAGCAGGGACA-3' e *reverse primer* 5'-CTGGCAGTCACCAGC GGAACAG-3'; PRLR - *forward primer* 5'-ATCATCACAGTAAATGCCACGAAC -3' e *reverse primer* 5'-GATGACAGCAGAGAGAACGGCCAC-3'; GAPDH *forward primer* 5'-CTCGTCCCGTAGACAAAATGG-3' e *reverse primer* 5'-TG ACCAGGCGCCCAATA-3'. Os níveis de expressão gênica relativos foram calculados a partir do método de análise comparativa  $G_t (2^{-\Delta CT})$ .

### **3.4. Dosagem de corticosterona por radioimunoensaio**

Amostras de plasma e timo foram obtidas simultaneamente a partir de animais controles e infectados com 8, e 14 dpi. O sangue foi obtido por punção cardíaca, com uma seringa de 1mL contendo 40U/ml de heparina, imediatamente após os animais serem eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, no período entre 21 e 03 h, horário esse quando se observa o pico de liberação de corticosterona para a corrente sangüínea. Após centrifugação por 15 min, a 450g, o sobrenadante recolhido foi mantido a -20°C.

Para a quantificação de hormônios no timo, foi utilizado o seguinte procedimento: após a remoção, o órgão foi conservado em nitrogênio líquido e em seguida descongelado, ressuspenso em 2 ml de RPMI/ SBF10%, sendo a seguir triturado em homogeneizador de tecido, na velocidade 6, por aproximadamente 5 minutos; sendo então submetido à sonicação durante 30 minutos. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi imediatamente estocado em freezer -80 °C.

A quantificação do hormônio foi realizada através da técnica de radioimunoensaio (RIA, Radio Imune Assay) em *kits* da MP Biomedicals. Neste



ensaio foi avaliada a capacidade do hormônio presente nas amostras de plasma em competir com amostras do hormônio marcado radioativamente ( $I^{125}$ ) pela ligação ao anticorpo específico. O produto da reação foi analisado em comparação com uma curva padrão. A quantificação foi realizada em contador gama (ISOMEDIC-ICN 4/600).

### **3.5. Dosagem de prolactina plasmática por ensaio imunoenzimático**

A quantificação de PRL plasmática foi realizada através de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) em kit da empresa Calbiotech (Califórnia, EUA). As amostras e anticorpos anti prolactina biotinilados foram adicionados aos poços previamente incubados com anticorpo anti prolactina. Após 60 minutos a proteína não ligada e o conjugado de biotina foram lavados, e a estreptoavidina conjugada à peroxidase adicionada por mais 30 minutos. Após esse período o complexo não ligado foi novamente lavado e o substrato TMB adicionado para revelação. A reação foi terminada e a absorbância foi medida em leitor de ELISA no comprimento de 450 nm. O produto da reação foi analisado em comparação com uma curva padrão.

### **3.6. Expressão intratímica de prolactina e receptor de glicocorticóide**

Timos obtidos de animais controles e infectados com 8 e 14 dpi foram mantidos em solução de formol-zinco 10% por aproximadamente 48 h. Após esse período, as amostras foram desidratadas e clarificadas em baterias de concentração crescente de álcool e xilol (15 minutos cada), respectivamente. Em seguida, foram embebidas em parafina (2 ciclos de 20 minutos) e incluídas em moldes metálicos. Os blocos de parafina assim obtidos foram cortados em micrótomo.

Para detecção de diferentes proteínas pela técnica de imunoperoxidase, os cortes histológicos foram desparafinados e hidratados em concentrações decrescentes de xilol e álcool, respectivamente (5 minutos cada). Após a exposição antigênica em solução de citrato de sódio (100°C, 30 min), procedeu-se ao bloqueio de peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos monoclonais anti PRL e anti GR a 4°C e por 18 h. Após repetidas lavagens e bloqueio de biotina endógena, os cortes

incubados com anticorpo secundário biotilado e após 60 minutos com o complexo streptavidina ABC/peroxidase (Dako Co., Carpinteria, EUA). A revelação da atividade enzimática foi feita com 3'5'-diaminobenzidina. Uma vez corados com hematoxilina, desidratados e clarificados, a reação foi analisada em microscopia óptica. Como controle de marcação inespecífica foram utilizados cortes não-incubados com o anticorpo primário.

### **3.7. Expressão intratímica de Bax e Bcl-xl**

Timócitos obtidos simultaneamente de animais controle e infectados com 8 e 14 dpi, tratadas ou não com dexametasona, foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com 90  $\mu$ L do tampão de extração (Triton 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,2%, NaCl 150 mM Hepes 10 mM, EDTA 2 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, NaF 20 mM, AEBSF 1,04 mM, aprotinina 0,8  $\mu$ M, leupeptina 20 $\mu$ M, estatina 40  $\mu$ M, pepstatina A 0,15 mM e E-64 0,14 mM). Após serem recolhidas, as células foram transferidas para tubos de 1,5 mL onde foram adicionados 30  $\mu$ l de tampão contendo 20% de  $\beta$ - mercaptoetanol (solução estoque 5X: 4,5 g de Tris, 10 mL de glicerol, 10 mL de 0,1% azul de bromofenol, 15 g de SDS em volume final de 75 mL, pH 6,8). As amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos e armazenadas a -20°C, sendo normalizadas pelo número de células.

O lisado total foi submetido à SDS-PAGE (10% acrilamida/Bis 29:1) a 28 mA/gel, em condição desnaturante (Tris Base 30,3 g/L, SDS 10 g/L e Glicina 144 g/L), por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. As bandas resultantes foram transferidas para membranas de nitrocelulose (porosidade de 0,45  $\mu$ m, BioAgency, São Paulo, Brasil), a 250 mA, por 2 h e a 4°C, em tampão de transferência (Metanol 500 mL, água destilada 2 L, Tris Base 7,57 g e Glicina 36,05 g). Em seguida, as membranas foram incubadas com tampão de bloqueio contendo 5 % de leite em pó desnatado (Nestlé) por 2 h. As membranas foram então lavadas seis vezes com tampão TTBS 0,05% por aproximadamente 5 minutos/vez sob agitação e à temperatura ambiente. A seguir, foram incubadas com anticorpo primário por 16 h, sob agitação, a 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram anti Bax, anti GAPDH e anti Bcl-xl. Após novas lavagens as membranas foram incubadas com anticorpos

secundários biotinilados durante 1 hora. A revelação da reação foi detectada por quimioluminescência, utilizando-se o substrato ECL. A imagem das bandas formadas foi analisada por densitometria com utilização do Software ScnImage.

### **3.8. Ensaio *in vitro* de indução/proteção de apoptose por glicocorticóide e prolactina**

Para verificação da sensibilidade à apoptose induzida por GC, timócitos foram inicialmente cultivados com diferentes concentrações de dexametasona ( $10^{-7}$  a  $10^{-11}$ M) (Sigma-Adrich., St. Louis, EUA) em placas de 96 poços de fundo V, utilizando-se  $10^6$  células/poço, durante 12 h em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Selecionamos a concentração de  $10^{-8}$ M para ser utilizada em todos os experimentos seguintes, por induzir um percentual de morte celular somente moderado. Um possível efeito do balanço entre PRL e GC na sobrevivência de timócitos foi estudado. Para isso, estabelecemos um modelo *in vitro*, no qual ambos os hormônios foram utilizadas para estudar seu efeito na indução de apoptose/sobrevivência de timócitos. Nesse modelo, timócitos obtidos de animais controles, com 8 e 14dpi foram mantidos em cultura previamente à adição de dexametasona com PRL  $10^{-9}$ M (Sigma-Adrich., St. Louis, EUA), durante 1 h, em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Em seguida, as células foram lavadas em tampão PBS e colocadas em cultura por mais 12 h com dexametasona a  $10^{-8}$ M. Visando-se eliminar um possível efeito de PRL e corticosterona existente em soro fetal bovino, utilizamos nesses ensaios meio livre de soro para cultura de hibridoma (Sigma-Adrich, St. Louis, EUA).

### **3.9. Análise estatística**

Devido ao baixo tamanho amostral, a comparação das médias foi feita a partir de um teste de permutação. A probabilidade da diferença observada entre as médias foi estimada utilizando uma distribuição empírica construída a partir de 1000 reamostragens aleatórias dos dados originais. O procedimento de Sidak foi utilizado para corrigir o valor de p em cada análise, devido ao grande número de testes realizados. Foi considerada significativa uma diferença com  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

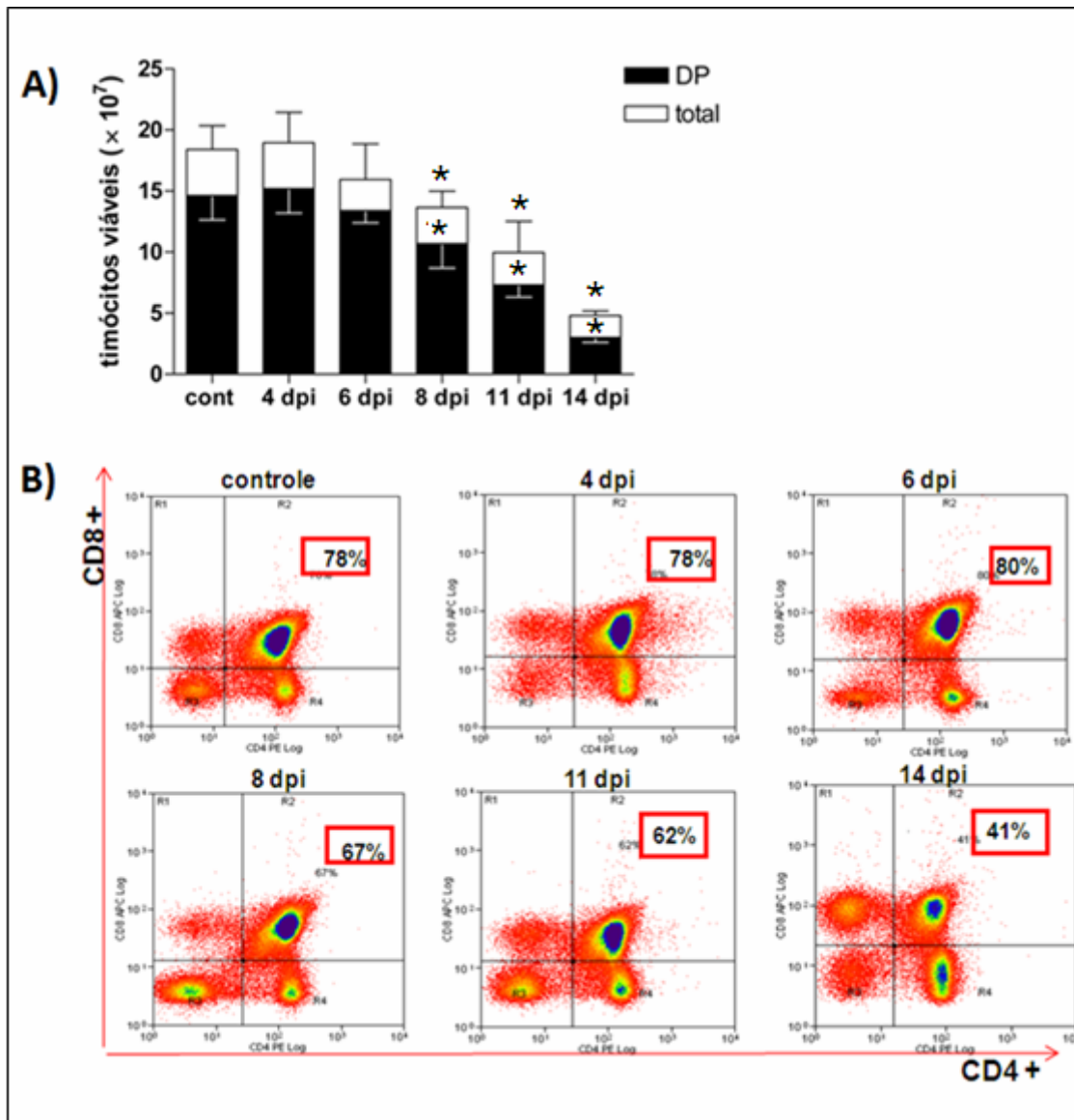
### 4.1. Caracterização da atrofia tímica durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*

Com objetivo de verificarmos a cinética de atrofia tímica frente à infecção experimental por *T. cruzi*, camundongos BALB/c machos foram infectados em diferentes dias com o inóculo de 100 parasitos/animal. Ao final de 14 dias de infecção, obtivemos timos de diferentes grupos de animais eutanaziados simultaneamente, com 4, 6, 8, 11 e 14 dpi. A celularidade de cada órgão foi obtida através da contagem de células viáveis por exclusão em azul de Tripán. Conforme ilustrado na figura 4.1A, observamos diminuição significativa do número de timócitos em 8, 11 e 14 dpi quando comparados aos animais controles. A caracterização fenotípica das subpopulações de timócitos (Figura 1B) demonstrou ser a DP a principal subpopulação afetada durante a atrofia tímica induzida por *T. cruzi*, apresentando em 14 dpi redução dos valores totais de aproximadamente 70% em relação ao grupo controle não-infectado. Nesse sentido, a detecção de resíduos de fosfatidilserina por anexina V revelou que tal redução está associada à morte por apoptose dessas células. A presença de apoptose foi caracterizada em timócitos obtidos a partir de 8 dpi, sendo o auge dos valores percentuais de DP apoptóticas observado em 11 dpi. No período de 14 dpi, o percentual de células apoptóticas apresentou tendência à redução em direção ao controle, sugerindo estabilização do processo de atrofia tímica nesse período (Figura 4.2).

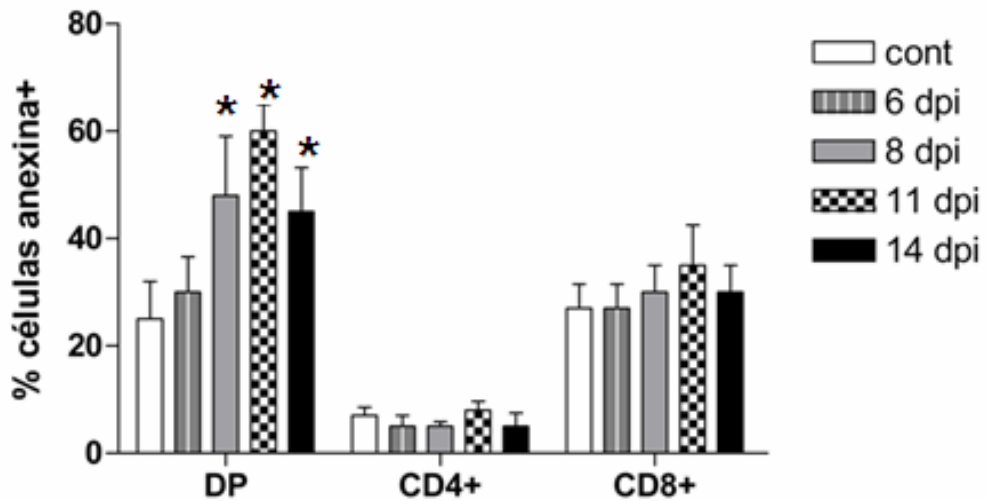
A partir da caracterização do perfil de atrofia tímica no modelo de infecção por *T. cruzi* utilizado, selecionamos dois diferentes pontos na cinética de infecção a serem avaliados nesse estudo comparando-se, para isso, valores obtidos de animais controles, não-infectados, com aqueles obtidos nas condições de 8 e 14 dpi.

Através da análise por *immunoblotting* verificamos, nessas condições, variação da expressão intratímica das proteínas Bcl-xl e Bax, respectivamente anti e pró-apoptóticas. A detecção de Bax foi maior em timos obtidos de animais com 8 dpi, quando comparada ao controle. Quando avaliada em 14 dpi observou-se redução da expressão dessa proteína em relação a 8 dpi embora, ainda sim, o nível de detecção tenha sido superior ao controle (Figura 4.3.A-B).

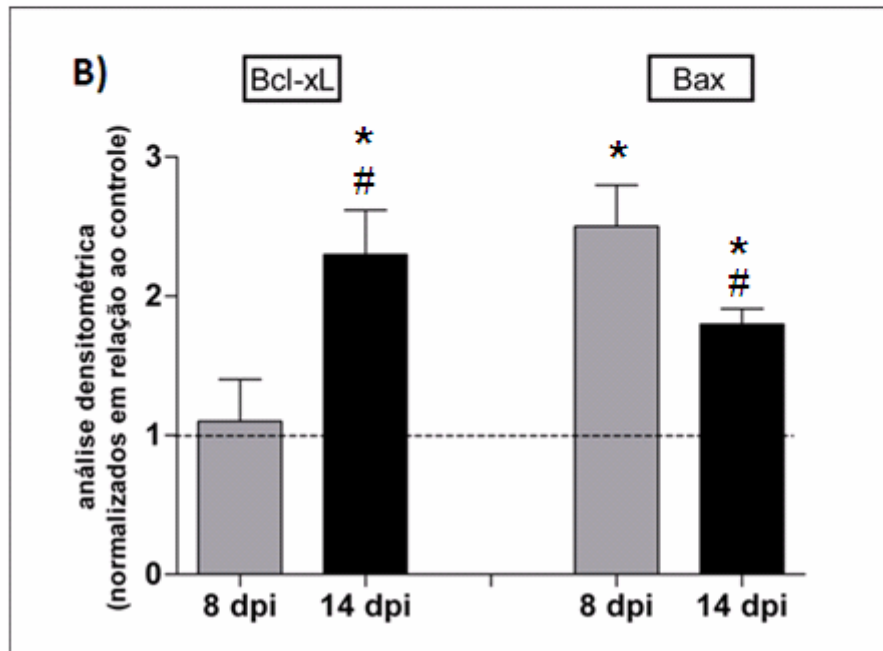
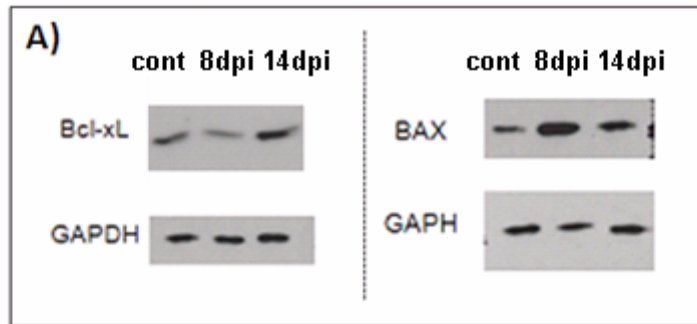
Paralelamente, sob as mesmas condições, verificamos aumento significativo da proteína Bcl-xl em 14 dpi.



**Figura 4.1. Análise da atrofia tímica induzida pela infecção experimental por *T. cruzi*.** (A) O número de timócitos em cada dia da cinética infecciosa foi obtido utilizando-se os valores de contagem celular em câmara de Neubauer. Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. N=5 animais/grupo. \* $p < 0,05$  comparado aos respectivos controles. (B) Perfil fenotípico de subpopulações timocitárias definidas pela expressão de CD4 e CD8, durante a fase aguda da infecção. Representação citofluorométrica de um experimento formado por pool de 3 timos.



**Figura 4.2. Apoptose em subpopulações de timócitos durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*.** Timócitos obtidos de animais em diferentes dias de infecção foram caracterizados quanto ao percentual de apoptose, através da marcação anexina V-FITC. A comparação dentre as diferentes subtipopulações de timócitos foi realizada através da marcação simultânea de CD4 e CD8. Valores percentuais estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. N=5 animais/grupo. \* $p < 0,05$  comparado aos respectivos controles.



**Figura 4.3. Expressão de Bcl-xL e BAX durante a atrofia tímica induzida por *T. cruzi*.** A expressão das proteínas Bcl-xL e BAX foi verificada por *western blotting* em timos obtidos de animais não-infectados (cont) e infectados com 8 e 14 dpi. (A) Revelação das membranas após transferência eletroforética. (B) Análise densitométrica da expressão protéica. \* $p < 0,05$  comparado aos respectivos controles. # $p < 0,05$  comparado a 8 dpi.

#### **4.2. Circuito intratímico de glicocorticóide durante a infecção experimental por *T. cruzi***

Investigamos se a modulação de fatores apoptóticos intratímicos durante a infecção por *T. cruzi* estaria relacionada a alterações nas vias locais de síntese de GC. Para isso, primeiramente verificamos se uma possível alteração na expressão de GR e das enzimas StaR e Cyp11A, envolvidas na via de biossíntese de corticosterona, estaria relacionada à maior ocorrência de apoptose nas células DP, quando comparadas às SP. Verificamos modulação diferenciada dessas enzimas nas diferentes subpopulações analisadas. Enquanto em DP, os níveis de expressão de StaR se mantiveram constante no decorrer da infecção aguda, nas células SP esses níveis variaram, apresentando redução em 8 dpi (Figura 4.4B). Diferentemente, quando a expressão de Cyp11A foi avaliada, observamos variação da expressão gênica da enzima somente em DP, com aumento em 8 dpi e posterior restabelecimento ao nível do controle (Figura 4.4C).

Observamos o mesmo perfil de variação de GR para subpopulações de células DP e SP, com aumento da expressão gênica em 8 dpi e restabelecimento, em 14 dpi, a níveis fisiológicos do controle (Figura 4.4A). Essa modulação de GR foi confirmada através de análise imunohistoquímica (Figura 4.5), demonstrando, assim, que a variação da expressão gênica de GR observada em células purificadas é refletida no conteúdo intratímico do receptor.

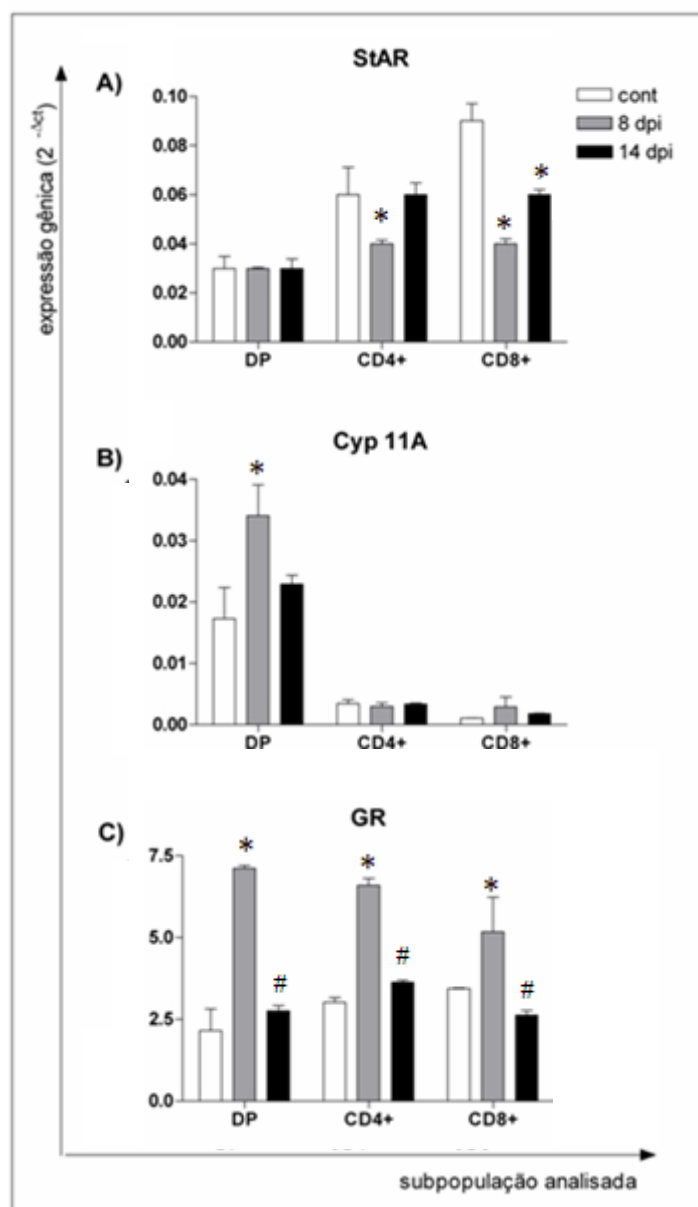
Uma possível interrelação na modulação das vias sistêmica e intratímica de síntese de GC durante a infecção por *T. cruzi* foi analisada através da dosagem de corticosterona em ambos os compartimentos. O aumento sistêmico de GC, característico da fase aguda da infecção, não foi observado no timo (Figura 4.6A-B). Em 8 dpi, encontramos uma redução em aproximadamente 60% na concentração intratímica de corticosterona, enquanto os níveis plasmáticos permaneceram inalterados. A quantidade intratímica do hormônio foi restabelecida em 14 dpi, ao mesmo tempo, que nesses animais, os níveis plasmáticos de corticosterona encontrava-se aumentados em aproximadamente 10 vezes em relação ao controle

Em acordo com os dados já descritos na literatura, que demonstram modulação inversa da expressão de GR frente à exposição do ligante (Miller et

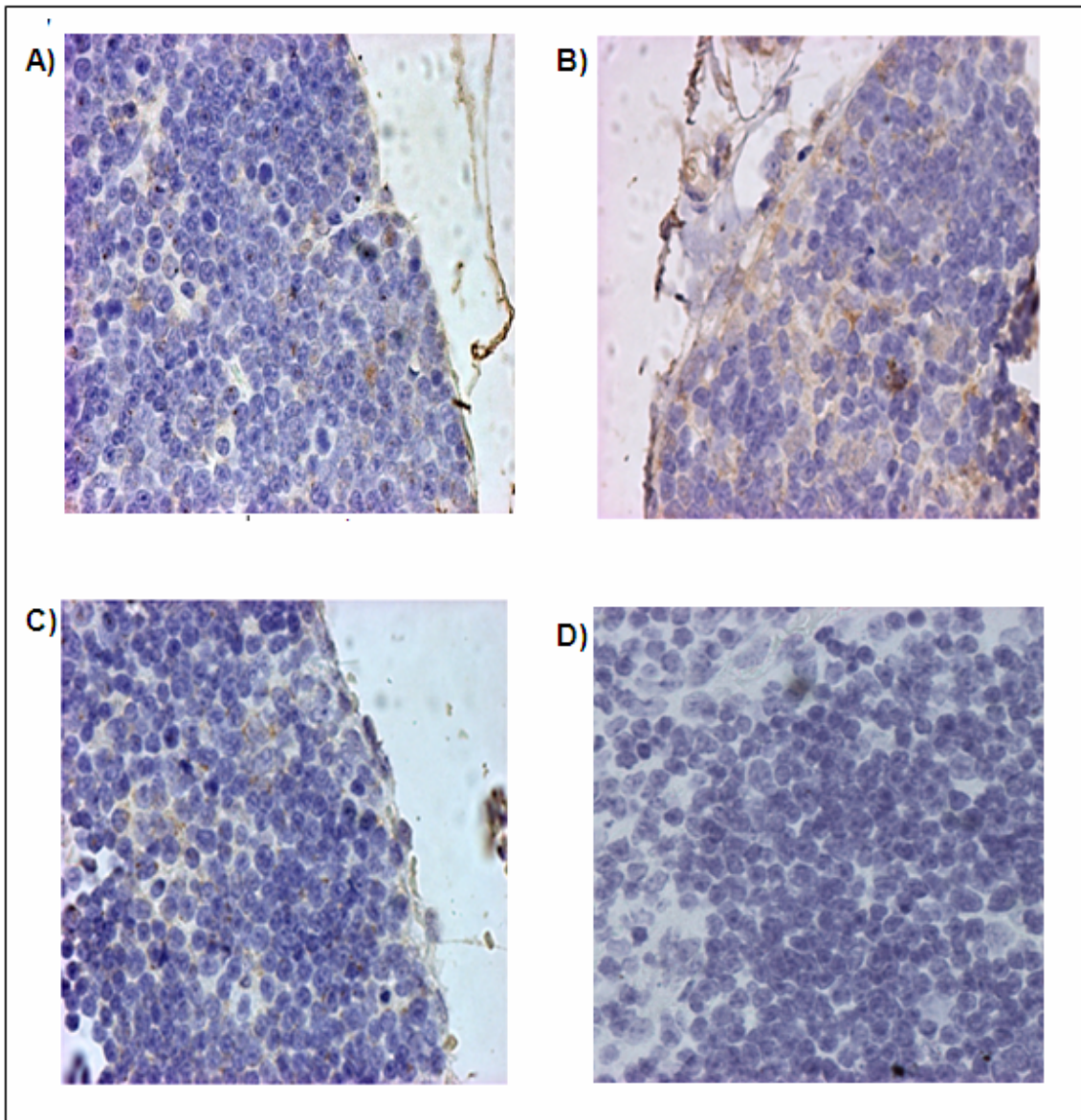


al., 1999; Sanden et al., 2000), verificamos existir relação entre a variação nos níveis de corticosterona intratímico e a expressão de GR em DP no curso da infecção aguda por *T. cruzi*. (Figura 4.7). Enquanto em 8 dpi os níveis de corticosterona intratímico encontraram-se reduzidos em relação ao controle, a expressão de GR aumentou. Por outro lado, em 14 dpi, quando os níveis intratímicos de corticosterona foram restabelecidos, a expressão de GR também reduziu, equiparando-se ao controle (Figura 4.7).

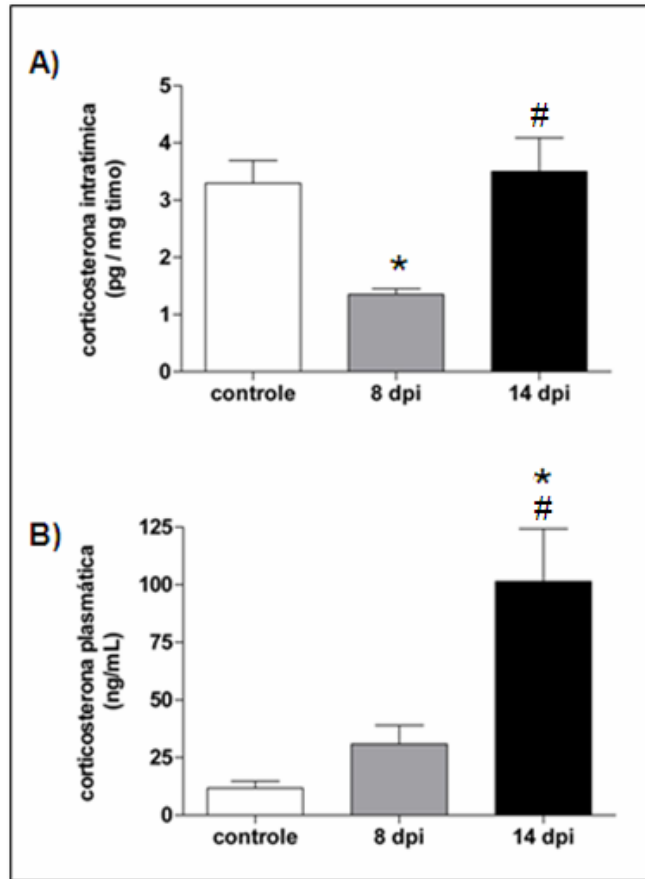
Buscando verificar se uma provável alteração no balanço intratímico das vias de síntese e degradação de corticosterona estaria relacionada às variações na concentração local do hormônio, analisamos a expressão intratímica das enzimas 11beta-HSD, subtipos 1 e 2 relacionadas, respectivamente, à ativação e inativação de corticosterona *in vivo*. Os dados encontrados demonstram aumento de expressão de ambas isoformas em 8 dpi, quando comparadas ao controle. Em 14 dpi, entretanto, apenas o subtipo 1 apresentou aumento significativo de expressão gênica (Figura 4.8A-B).



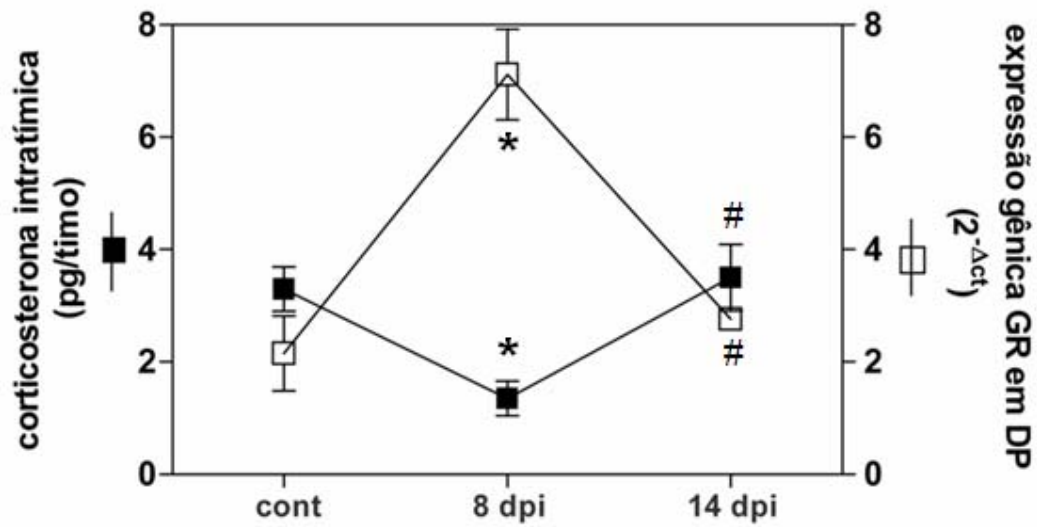
**Figura 4.4. Expressão gênica de StAR, Cyp11A e GR em subpopulações de timócitos durante a atrofia tímica decorrente da infecção pelo *T. cruzi*.** Timócitos DP, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram obtidos por técnica de enriquecimento celular a partir de *pool* de timócitos de animais controles e infectados com 8 e 14 dpi. Após extração de RNA e obtenção de cDNA a expressão de StAR (A) e Cyp11A (B), as duas principais enzimas envolvidas na biossíntese de corticosterona, foram definida por qPCR, assim como a de GR (C). Unidades relativas de expressão gênica estão mostradas como média±erro padrão. N=4 *pools* por grupo. Cada *pool* foi formado com células obtidas de 3 animais diferentes. \*p<0,05 comparado aos respectivos controles. #p<0,05 comparado a 8 dpi.



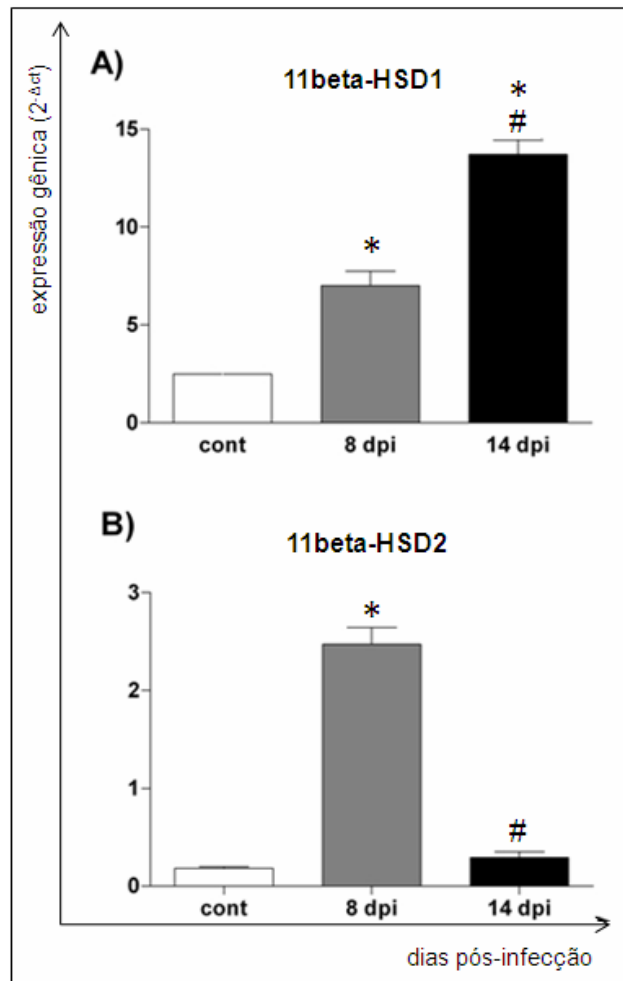
**Figura 4.5. Expressão intratímica de receptor de glicocorticóide durante a atrofia tímica induzida pela infecção pelo *T. cruzi*.** A detecção intratímica de GR foi realizada por imunohistoquímica em cortes desparafinados. Os timos analisados foram obtidos a partir de animais controles (**A**), infectados com 8 dpi (**B**) e 14 dpi (**C**). Como controle de marcação inespecífica foram utilizados cortes não-incubados com o anticorpo primário (**D**). Imagens representativas de um animal por grupo. Aumento total de 400×.



**Figura 4.6. Quantificação de corticosterona intratímica e plasmática.** (A) Os níveis de corticosterona foram verificados no sobrenadante obtido de extrato de timo total. Após a maceração mecânica em homogeneizador de tecidos e sonicação para o rompimento de todas as células, o sobrenadante foi obtido por centrifugação. A quantidade final de hormônio representada foi calculada com base na massa de cada timo. (B) As amostras de plasma para quantificação sistêmica foram obtidas a partir de sangue retirado através de punção cardíaca em solução de heparina. Em ambos os casos, a quantificação de corticosterona foi realizada por radioimunoensaio, comparando-se animais controles com infectados em 8 e 14 dpi. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. N=5 animais/grupo. \* $p < 0,05$  comparado aos respectivos controles. # $p < 0,05$  comparado a 8 dpi.



**Figura 4.7. Relação entre corticosterona intratímica e expressão de GR em DP.** As curvas obtidas para expressão gênica de GR em DP e corticosterona intratímica são apresentadas conjuntamente. Valores expressos em média ± erro padrão. N=5 animais/grupo. \*p<0,05 comparado aos respectivos controles. #p<0,05 comparado a 8 dpi.



**Figura 4.8. Expressão intratímica de 11beta-HSD1 e 11beta-HSD2 durante a atrofia tímica decorrente da infecção pelo *T. cruzi*.** Após a maceração mecânica do timo em solução de tiocinato de guanidina e sonicação para o rompimento de todas as células, o sobrenadante foi obtido por centrifugação. Após extração de RNA e obtenção de cDNA, a expressão gênica de 11beta-HSD1 e 11beta-HSD2, as duas principais enzimas envolvidas, respectivamente, na ativação e inativação de corticosterona *in vivo*, foi definida por Qpcr. Valores aleatórios de expressão gênica expressos em média  $\pm$  erro padrão. N=3 pools com grupo. Cada pool foi formado com células obtidas de 3 animais diferentes. \* $p < 0,05$ , comparado aos respectivos controles. # $p < 0,05$  comparado a 8 dpi.

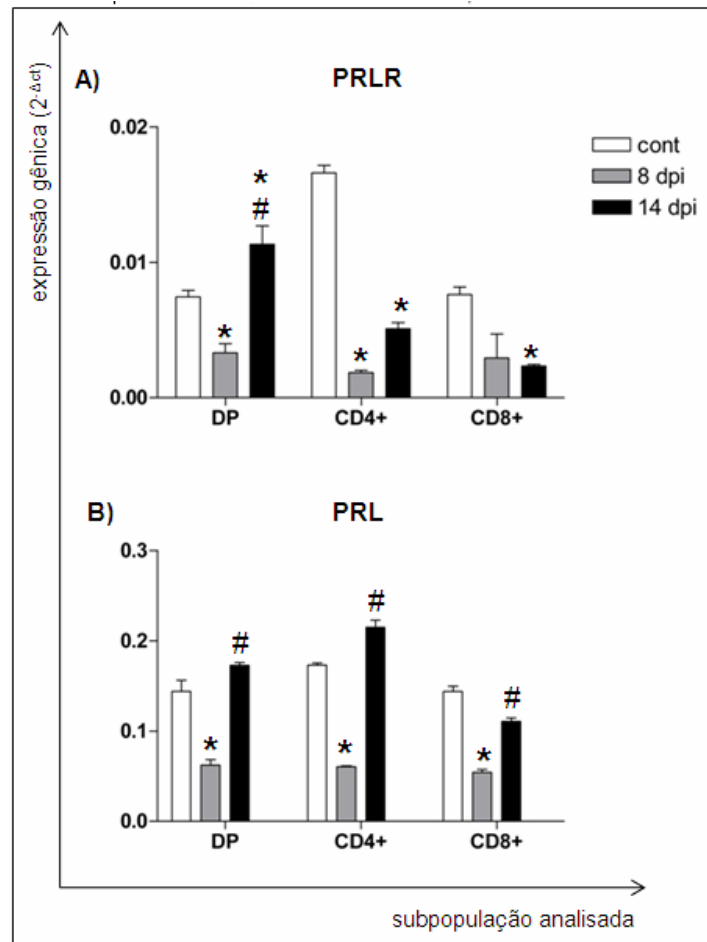
### **4.3. Efeito da infecção experimental por *T. cruzi* sobre a modulação intratímica de prolactina e seu receptor**

Investigamos se as variações observadas no circuito intratímico de GC ocorrem em paralelo à modulação de PRL durante a infecção por *T. cruzi*. Primeiramente, analisamos a expressão de PRLR nas diferentes subpopulações de timócitos. Verificamos modulação diferencial da expressão de PRLR na subpopulação DP em relação às células SP. Os dados encontrados demonstram que embora haja uma diminuição inicial da expressão de PRLR, em 8 dpi, tanto em DP quanto em SP, somente nas células DP houve restabelecimento dos níveis de PRLR em direção ao controle na fase mais tardia da infecção aguda, quando possivelmente somente as células mais resistentes à ação de GC sobreviveram. A expressão de PRLR manteve-se reduzida nas células SP durante todos os dias analisados.

A análise da expressão gênica de PRL em timócitos purificados demonstrou o mesmo padrão de expressão em todas as subpopulações, com redução da expressão em 8 dpi e posterior restabelecimento em 14 dpi ao nível do controle (Figura 4.9B).

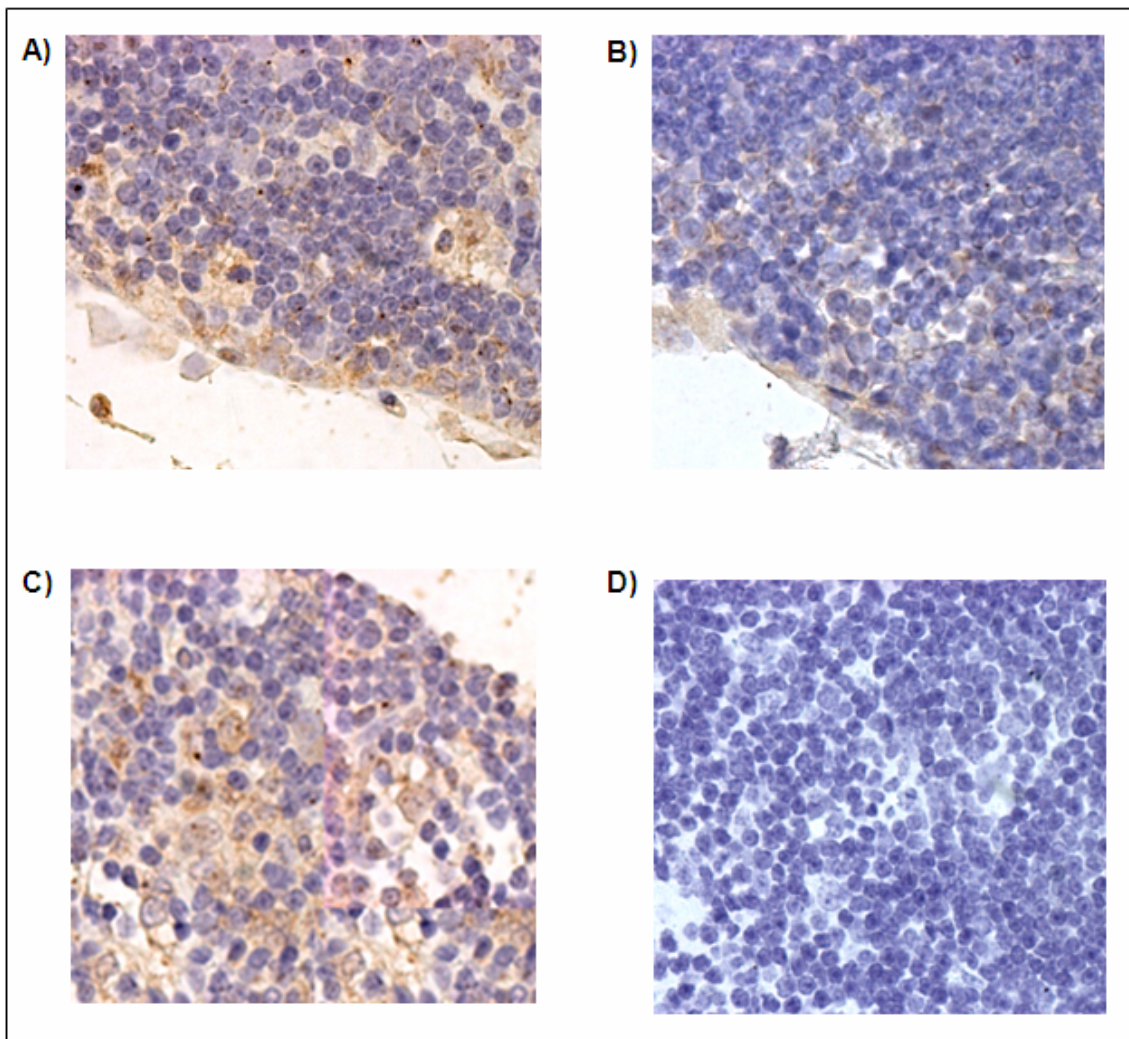
Dados obtidos por imunohistoquímica confirmam esses achados e demonstram que a variação da expressão gênica de PRL observada em células purificadas é refletida no conteúdo intratímico do hormônio (Figura 4.10).

Com o objetivo de verificarmos se as variações intratímicas de PRL estariam relacionadas à modulação do hormônio circulante, analisamos a concentração de PRL plasmática por ensaio imunoenzimático. Ao contrário do observado no timo, foi detectado aumento dos níveis circulantes do hormônio em 8 dpi com posterior restabelecimento em 14 dpi ao nível do controle (Figura 4.11).

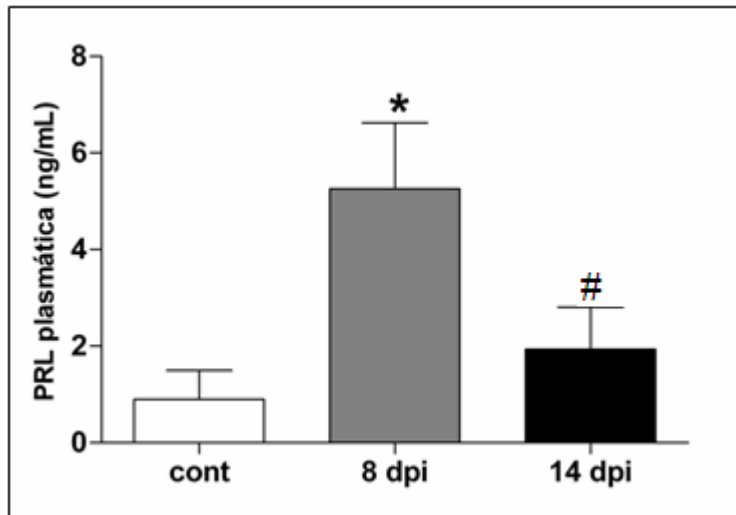


**Figura 4.9. Expressão gênica de PRLR e PRL em subpopulações de timócitos durante a atrofia tímica decorrente da infecção pelo *T. cruzi*.** Timócitos DP, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram obtidos por técnica de enriquecimento celular a partir de *pool* de timócitos de animais controles e infectados com 8 e 14 dpi. Após extração de RNA e obtenção de cDNA a expressão de PRLR (**A**) foi definida por qPCR, juntamente à PRL (**B**). Unidades relativas de expressão gênica estão mostradas como média±erro padrão. N=4 *pools* por grupo. Cada *pool* foi formado com células obtidas de 3 animais diferentes. \*p<0,05 comparado aos respectivos controles. #p<0,05 comparado a 8 dpi.





**4.10. Expressão intratímica de PRL.** A detecção intratímica de PRL foi realizada por imunohistoquímica em cortes desparafinados. Os timos analisados foram obtidos a partir de animais controles (**A**), infectados com 8 dpi (**B**) e 14 dpi (**C**). Como controle de marcação inespecífica foram utilizados cortes não-incubados com o anticorpo primário (**D**). Imagens representativas de um animal por grupo. Aumento total de 400x.

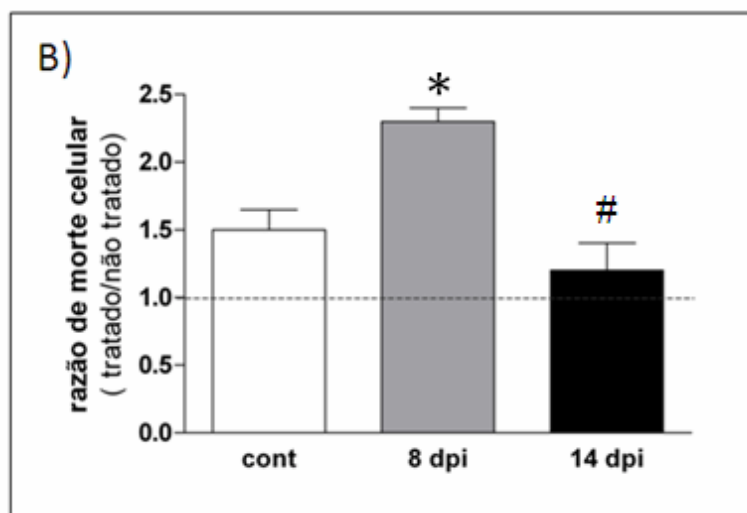
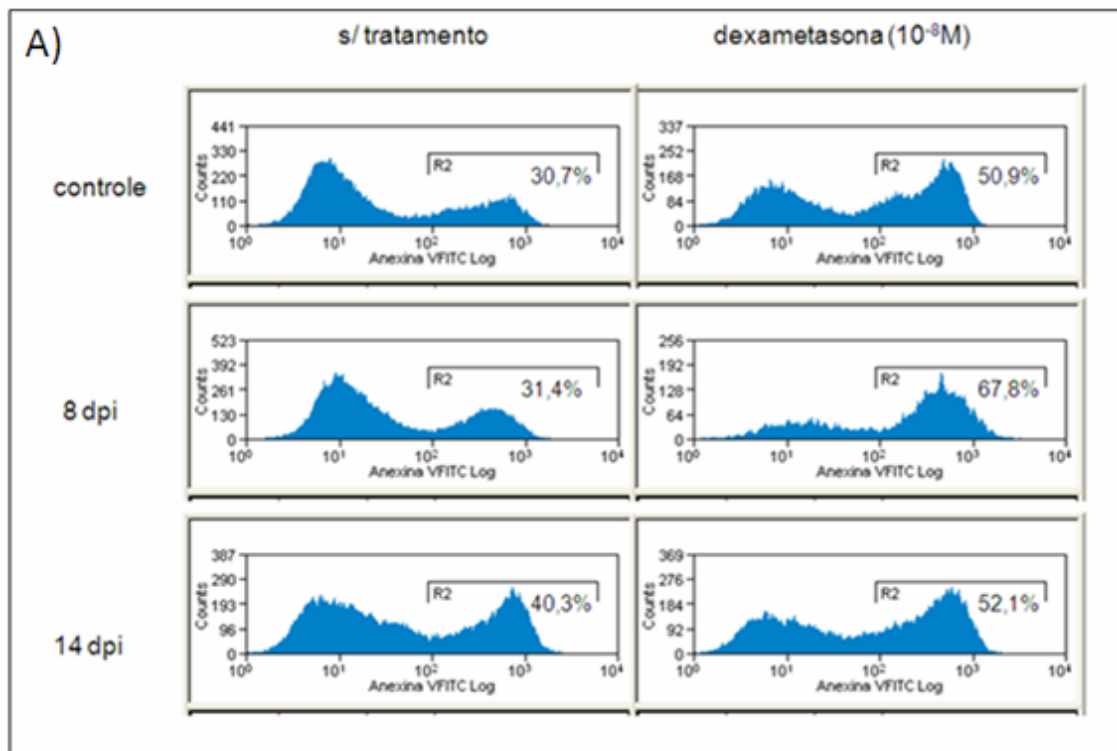


**Figura 4.11. Dosagem de prolactina plasmática.** As amostras de plasma para dosagem sistêmica de prolactina foram obtidas a partir de sangue retirado através de punção cardíaca em solução de heparina. A quantificação foi realizada por ensaio imunoenzimático, comparando-se animais controles com infectados em 8 e 14 dpi. N=5 animais/grupo. \* $p < 0,05$  comparado aos respectivos controles. # $p < 0,05$  comparado a 8 dpi.

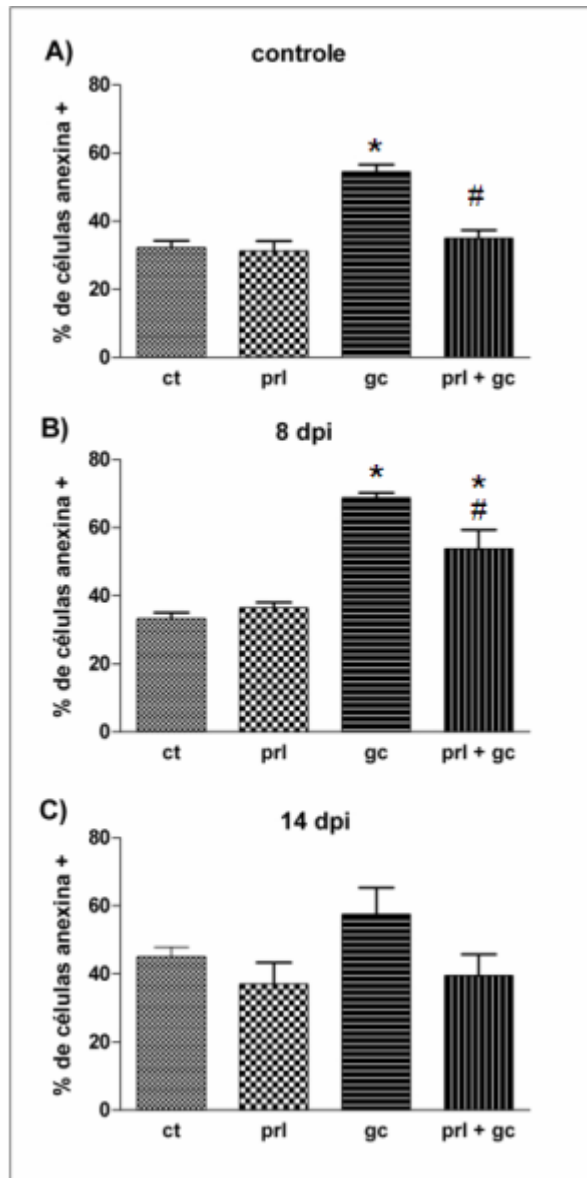
#### **4.4. Suscetibilidade de timócitos à morte celular induzida por glicocorticóide: efeito protetor de prolactina**

Com base nos dados obtidos que demonstram modulação da expressão intratímica de PRLR e GR durante a infecção experimental por *T. cruzi*, procuramos definir se tais mudanças estariam relacionadas à variação da suscetibilidade de timócitos à indução de apoptose por GC. Através de um modelo estabelecido *in vitro*, adicionamos dexametasona na concentração de  $10^{-8}$ M junto a timócitos obtidos de animais controles e infectados com 8 e 14 dpi. Observamos que o efeito pró-apoptótico de dexametasona foi mais perceptível em timócitos obtidos de animais com 8 dpi, quando comparado ao grupo controle, o que corrobora com os nossos achados.

Nessas mesmas condições, verificamos o efeito protetor de PRL frente à morte celular induzida por GC. Quando timócitos obtidos de animais não-infectados foram tratados com PRL  $10^{-9}$ M por 1h, previamente à exposição de dexametasona, verificou-se efeito de proteção total desses timócitos da morte induzida por GC, com detecção dos níveis de células apoptóticas semelhante ao controle (Figura 4.13A). Por outro lado, quando o mesmo ensaio foi realizado com timócitos obtidos de animais com 8 dpi, esse efeito protetor foi somente parcialmente observado (Figura 4.13B). Em timócitos obtidos de animais com 14 dpi, os níveis de apoptose induzida por GC não foram significativos em relação ao controle e, por conseguinte, o efeito protetor de PRL também não foi perceptível (Figura 4.13C).



**Figura 4.12.** Variação da suscetibilidade de timócitos à apoptose induzida por dexametasona entre os diferentes dias da cinética de infecção. Células obtidas de timos de animais não-infectados (controles) e infectados com 8 e 14 dpi foram colocadas em cultura com dexametasona (10<sup>-8</sup> M) durante 12 h. Após esse período as células foram lavadas e marcadas com anexina V-FITC para a caracterização de apoptose. (A) Perfil citofluorimétrico de células apoptóticas. Imagem representativa de um animal/grupo (B) Razão de apoptose entre os grupos tratados e não-tratados. N=5 animais/grupo. \*p<0,05 comparado aos respectivos controles. #p<0,05 comparado a 8 dpi.



**Figura 4.13. Verificação da atividade anti apoptótica de PRL em timócitos obtidos em diferentes dias da infecção.** Timócitos obtidos de animais não-infectados (A) e infectados com 8 (B) e 14 (C) dpi foram colocadas em cultura com dexametasona ( $10^{-8}$  M), associado ou não à adição prévia de PRL ( $10^{-9}$ M), durante 12 h. Após esse período as células foram lavadas e marcadas com anexina V-FITC para a caracterização de apoptose. Representação do percentual de células apoptóticas nos diferentes grupos. N=5 animais/grupo \* $p \leq 0,05$  comparados ao grupo controle e # $\leq 0,05$  comparado a gc.

## 5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm apontado PRL como uma importante substância imunomoduladora. A hipótese vigente é que em situações de estresse onde os níveis de glicocorticóides estejam aumentados, a ativação de PRLR possa prevenir a morte celular induzida pela ativação de GR. (Weimann et al., 1999; Biswas et al., 2006).

Uma vez que durante a fase aguda da doença de Chagas experimental existe um desequilíbrio neuroimunoendócrino dos camundongos infectados, caracterizado por altos níveis de glicocorticóide sistêmico (Brener & Gazzinelli, 1999; Perez et al., 2007) e modulação da secreção de PRL hipofisária (Correa-de-Santana et al., 2009), buscamos estabelecer um modelo para verificar uma possível interação entre esses hormônios durante o processo de atrofia tímica característica da fase aguda dessa infecção. Para isso, em um primeiro momento, buscamos caracterizar a cinética de atrofia tímica característica do nosso modelo. Verificamos que, utilizando camundongos BALB/c machos de aproximadamente seis semanas, infectados com 100 formas tripomastigotas do parasita (*T. cruzi*, cepa *Tulahuen*, *ip*), o processo de atrofia tímica começou a ser instalado em 8 dias pós infecção (8 dpi); essa atrofia atingiu o seu grau máximo em 14 dpi, quando houve uma redução de celularidade de aproximadamente 70% em relação ao grupo controle não-infectado. De fato, conforme já descrito na literatura, demonstramos ser a DP a principal subpopulação de timócitos afetada durante esse processo (Leite-de-Moraes et al, 1991; Perez et al, 2007).

O motivo pelo qual as células DP são mais sensíveis à indução de morte por apoptose por GC ainda não está bem elucidado. Especula-se que o principal fator seja a ausência de sinalização mediada por CD28 nessas células (van den Brandt et al, 2004). Nesse contexto, a ativação desta molécula juntamente com o GR levaria a um aumento da proteína anti apoptótica Bcl-xl, capaz de inibir a morte celular induzida por GC (Chao et al., 1995).

O maior percentual de células apoptóticas identificadas ocorreu em 11 dpi, quando se observou no timo desses animais um aumento de células DP apoptóticas em aproximadamente 3 vezes em relação ao controle não-infectado. Em 14 dpi, no entanto, observamos tendência ao restabelecimento desse percentual, demonstrando que nessa fase, os timócitos DP que

resistiram à indução de apoptose, constituem-se em uma população diferenciada de células mais resistentes.

Buscando verificar se a maior sensibilidade de DP à apoptose poderia também estar relacionada à modulação diferencial dos níveis autócrinos de corticosterona sintetizada, comparamos a expressão gênica de StAR e Cyp11A - as principais enzimas envolvidas na via de biossíntese de GC - entre as diferentes subpopulações de timócitos purificadas definidas pelos marcadores CD4 e CD8. Observamos uma modulação diferencial dessas enzimas na subpopulação de células DP, em relação às subpopulações SP CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as quais apresentaram o mesmo padrão de expressão entre si. Os dados obtidos indicam que os níveis autócrinos de produção de corticosterona por DP são maiores que nas células SP, onde observou-se redução da expressão de StaR em 8dpi ao mesmo tempo em que a expressão de CyP11A esteve aumentada somente na subpopulação DP, sem apresentarem alteração nas células SP. Dessa forma, e em acordo com dados já publicados (Vacchio et al., 1994; Qiao et al., 2008), a produção autócrina de corticosterona pelos timócitos em diferenciação parece ser um importante fator de sobrevivência para essas células.

A partir desses dados, optamos por analisar o balanço intratímico das vias de GR e PRLR em dois pontos específicos da curva de infecção. Os dias selecionados foram 8 e 14 dpi, quando animais no início do processo de atrofia tímica foram comparados àqueles em que o processo de morte celular encontra-se estabilizado. Supondo que nesse período mais tardio somente algumas células mais resistentes à ação de GC sobreviveram, essa análise nos permitiu traçar um perfil de comparação com a situação inicial de atrofia em que esses timos estão mais susceptíveis à ação de GC.

A análise desses diferentes momentos nos permitiu verificar possíveis alterações da homeostasia tímica, responsáveis pela atrofia tímica decorrente da infecção. Dados obtidos pela detecção das proteínas apoptóticas Bax e Bcl-xl demonstraram perturbação do equilíbrio local das vias de morte celular durante o processo de atrofia tímica. Vimos aumento da proteína pró-apoptótica Bax em ambos 8 e 14 dpi, embora na fase mais tardia esse aumento estivesse sido menos expressivo, aparentando tendência de restabelecimento em relação aos níveis do controle. Esses dados estão de

acordo com o aumento da proteína anti apoptótica Bcl-xl em 14 dpi que, sabidamente, reduz a ação pró-apoptótica de Bax por formar dímeros com a mesma e diminuir a quantidade da proteína livre capaz de gerar apoptose nessas células (Brandt et al., 2004).

Em uma etapa seguinte, investigamos se a modulação de tais fatores estaria relacionada à alteração das vias locais de GC. Observamos um aumento da expressão intratímica de GR em 8 dpi, com posterior redução em 14 dpi para os níveis do controle. Tal modulação ocorreu em todas as subpopulações de timócitos e poderia estar relacionada ao aumento de expressão dos fatores pró-apoptóticos relacionados à instauração do processo de atrofia tímica nesses animais.

Uma vez que já é sabido que a expressão de GR é inversamente modulada pela concentração local disponível do ligante (Miller et al., 1999; Sanden et al., 2000), verificamos se uma possível alteração da concentração intratímica de corticosterona estaria relacionada a esses achados. De fato, existe uma correlação inversa entre a expressão de GR no timo e a disponibilidade do hormônio. Em 8 dpi, quando os níveis intratímicos do hormônio se encontraram reduzidos em aproximadamente 3 vezes em relação ao controle, ocorreu um aumento proporcional de GR nas células DP. Em 14 dpi ambos os fatores tenderam a restabelecer em relação ao controle. Uma vez que, conforme já descrito na literatura (Roggero et al., 2006; Perez et al., 2007), demonstramos aumento progressivo dos níveis plasmáticos de corticosterona durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, podemos verificar que o timo possui uma regulação própria das vias de GC, as quais parecem ser independentes da regulação sistêmica. A redução de expressão de GR nas células DP que sobrevivem em 14 dpi, quando os níveis sistêmicos de corticosterona atingiram seu valor máximo, poderia ser um importante mecanismo de proteção à apoptose induzida por GC. Uma vez que a disponibilidade intratímica de GC depende do balanço local entre as enzimas 11-beta HSD, subtipos 1 e 2, respectivamente responsáveis pela ativação e inativação de corticosterona local, o grande aumento da expressão intratímica do subtipo 1 em 14 dpi, sem alteração dos níveis do subtipo 2, sugere a participação dessa enzima no restabelecimento dos níveis intratímicos de GC.



Em uma próxima etapa investigamos as variações observadas no circuito intratímico de GC ocorreriam em paralelo à modulação de PRL. A análise da expressão da isoforma longa de PRLR nas diferentes subpopulações de timócitos demonstrou mais uma vez modulação diferencial da expressão de PRLR nas células DP em relação às simples positivas CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Enquanto nas células SP houve redução sustentada de PRLR durante 8 e 14 dpi, nas células DP essa redução ocorreu somente em 8 dpi, restabelecendo posteriormente em níveis até mesmo superiores ao grupo controle não-infectado. Uma vez que esse é o principal subtipo do receptor envolvido na sinalização de STAT5 (Bole-Feysot., 1998), nossos dados sugerem que a maior expressão de PRLR na fase mais tardia da infecção por *T. cruzi* possa ser um importante fator de resistência das células DP. É sabido que a ativação de PRLR resgata células T da morte induzida por GC (Weimann et al., 1999; Biswas et al., 2006), o que pode estar relacionado ao aumento da proteína anti apoptótica de Bcl-xl, caracterizado na fase mais tardia da infecção, em 14 dpi. De fato, os níveis de Bcl-xl, mas não de Bcl-2, são aumentados em resposta à sinalização de STAT5, o que constitui um importante fator de sobrevivência em muitos tipos celulares (Socolovsky et al., 1999; Grad et al., 2000)

Através da análise imunohistoquímica verificamos diminuição dos níveis intratímicos de PRL em 8 dpi e posterior restabelecimento ao nível do controle em 14 dpi. Tais dados foram confirmados pela análise da expressão gênica de PRL nas subpopulações de timócitos isoladas.

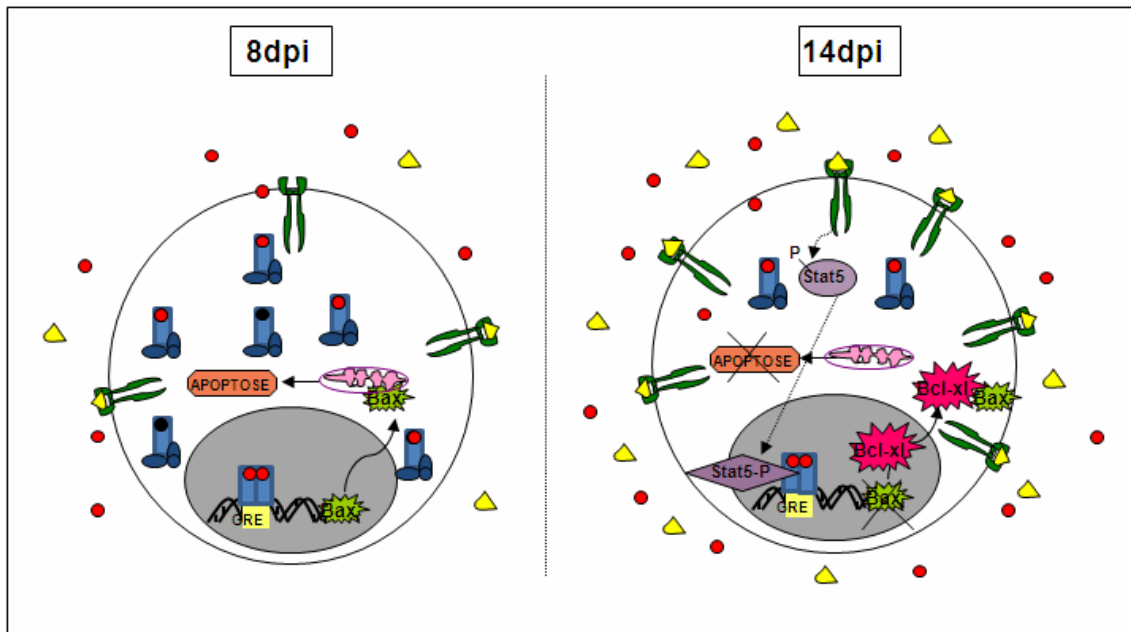
Com base nesses achados, verificamos os níveis plasmáticos de PRL. Assim como para corticosterona, encontramos diferença entre a síntese sistêmica e intratímica do hormônio, sugerindo mais uma vez um circuito de modulação intratímica específico e independente. Enquanto a quantificação dos níveis sistêmicos demonstrou aumento significativo da concentração de PRL em 8 dpi, com posterior restabelecimento aos níveis fisiológicos, no timo essa modulação ocorreu de forma inversa. Uma vez que, ao contrário de GR, a expressão de PRLR é induzida pela exposição ao ligante, que está localmente reduzido em 8 dpi, esses achados mais uma vez corroboram a hipótese de haver uma importante participação das vias de modulação intratímica de PRL na atrofia tímica característica da fase aguda da infecção por *T. cruzi*.

Frente a esse quadro de desregulação do balanço intratímico das vias de GR e PRLR, verificamos, através de ensaios funcionais *in vitro*, se tais alterações estariam relacionadas à modulação da suscetibilidade de timócitos, à morte celular induzida por GC, em animais infectados. Observamos uma maior indução de apoptose por dexametasona em timócitos obtidos de animais com 8 dpi, quando comparados aos respectivos controles, não-tratados. Considerando o aumento das vias de apoptose nos timos desses animais juntamente a uma maior expressão de GR e redução dos níveis de PRLR em células DP, verificamos que esses dados estão em total acordo com o esperado. Nesse sentido, também observamos que timócitos obtidos de animais com 14 dpi apresentam uma menor suscetibilidade à morte celular induzida por GC. Esses dados corroboram a importância da ação genômica de GC durante a atrofia tímica por *T. cruzi*. De fato, embora alguns efeitos não-genômicos estejam sendo apontados como importantes componentes para o processo de apoptose induzida por GC, é fundamental que ocorra formação dos produtos protéicos relacionados à transativação mediada por GR, como as proteínas Bax e Bad, além da ligação de GR ao DNA, como demonstrado em animais deficientes para essa ligação e cujos timócitos são resistentes à indução de morte por GC (Cole et al., 2001).

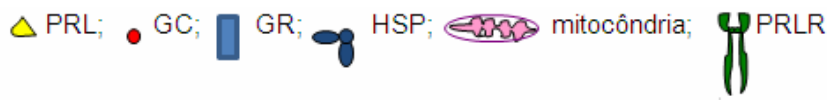
Com o objetivo de verificarmos o efeito protetor de PRL na indução de morte por GC, testamos, novamente através de uma abordagem *in vitro*, a resposta anti apoptótica desse hormônio frente à morte induzida por corticosterona. Observamos uma resposta reduzida de proteção em timócitos obtidos de animais com 8 dpi, quando comparados àqueles não-infectados. Uma vez que os níveis de PRLR expressos nas células DP encontram-se reduzidos nessa fase, esses dados demonstram a importância da expressão desse receptor para o efeito de proteção de PRL frente aos efeitos induzidos por GC.

Juntos, esses dados sugerem um importante papel do equilíbrio das vias intratímicas de GC e PRL na manutenção da homeostasia intratímica. Em acordo com achados anteriores, postulamos que a redução da sinalização de PRLR na fase inicial da infecção por *T. cruzi* resulte em aumento da apoptose induzida por GR. Por outro lado, a restauração do equilíbrio entre essas vias observado nas células que sobreviveram no período mais tardio da atrofia

tímica, parece estar relacionado à resistência dessas células à morte induzida por GC (Figura 5.1.).



**Figura 5.1. Hipótese de interações entre GR e PRLR na célula DP durante a atrofia tímica causada por *T. cruzi*.** Em 8 dpi, momento em que a célula DP está mais susceptível à morte por apoptose e o processo de atrofia tímica é instaurado, a sinalização de PRLR está baixa e o efeito de GR sobrepõe nos mecanismos de ativação gênica, gerando, conseqüentemente, indução de apoptose. Por outro lado, em 14 dpi, ocorre equilíbrio entre a sinalização de PRLR e GR, através de Stat5-P, a sinalização de PRLR sobrepõe a de GR. Nesse ponto, a interação de Stat5-P com GR, inibiria a transcrição de Bax ao mesmo tempo estimulando a síntese da proteína anti apoptótica Bcl-xl e o efeito de proteção da apoptose por PRL seria então observado nas células sobreviventes em 14 dpi.



Ressaltamos ainda que, o desequilíbrio neuroimunoendócrino característico da fase aguda da infecção por *T. cruzi* parece ser muito mais complexo do que já foi descrito. Aparentemente, a diminuição das vias intratímicas de PRL sensibiliza o timócito à ação pró-apotótica de GC. Dessa forma, estudos adicionais utilizando-se inibidores das vias biossintéticas de GC e PRL estão sendo formulados. Essas novas abordagens, em conjunto com os dados da presente dissertação, contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos de controle da morte celular no curso da infecção aguda pelo *T. cruzi*

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a conclusão desse trabalho conseguimos alcançar a nossa principal meta proposta, que foi verificar o envolvimento dos circuitos intratímicos de PRL e GC na atrofia tímica característica da fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Dessa forma, através dos diversos experimentos executados que envolveram abordagens celulares e moleculares em camundongos adultos jovens infectados, verificamos que:

- 1) A instauração do processo de atrofia tímica em 8 dpi, está relacionada à morte por apoptose de células DP devido a uma maior sinalização de GC em paralelo à redução de PRLR e seu ligante nessas células;
- 2) A resistência de células DP à ação pró-apoptótica de GC nas fases mais tardias da infecção pelo *T. cruzi* está relacionada ao aumento das vias de PRLR em paralelo à redução das vias de GR;
- 3) A produção intratímica de GC e PRL independe da biossíntese sistêmica, e parece ser a principal responsável pelo balanço de morte/sobrevivência de timócitos durante a infecção pelo *T. cruzi*, através da modulação local de seus respectivos receptores;
- 4) A preservação do equilíbrio exercido pela sinalização cruzada (*cross-talk*) entre GR e PRLR é um importante fator para a manutenção da homeostasia tímica em situações de estresse fisiológico que ocorrem durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Dando continuidade a esse estudo pretendemos, nos próximos experimentos, verificar o efeito da inibição direta das vias biossintéticas de GC e PRL na atrofia tímica infecciosa complementando, assim, os nossos achados a cerca da contribuição do equilíbrio intratímico da sinalização de PRLR e GR para a manutenção da homeostasia tímica durante a infecção pelo *T. cruzi*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrams MT, Robertson NM, Yoon K. & Wickstrom E. Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by targeting the major splice variants of BIM mRNA with small interfering RNA and short hairpin RNA. (2004). *J Biol Chem.* **279**, 55809–5581.
2. Aguilar, LK, E Agilar-Cordova, J Cartwright, Jr, & JW Belmont. Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. (1994). *J Immunol.* **152**, 2645–51.
3. Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. (1999).
4. Alves LA, Nihei OK, Fonseca PC, Campos-de-Carvalho AC & Savino W. Gap junction modulation by extracellular signaling molecules: the thymus model. (2000). *Braz J Med Biol Res.* **33**, 457–65.
5. Anderson G, Moore NC, Owen JJ & Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. (1996). *Annu Rev Immunol.* **14**, 73–99.
6. Andrade Z. Immunopathology of Chagas Disease . (1999). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**, 71-80.
7. Aspinall R & Andrew D. Thymic involution in aging. (2000). *J Clin Immunol.* **20**, 250-56.
8. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G & Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. (2000). *Science.* **289**, 2344–47.
9. Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A & Buttgerit F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. (2004). *FASEB J.* **18**, 70-80.
10. Baumann S, Dostert A, Novac N, Bauer A, Schmid W, Fas SC, Krueger A, Heinzl T, Kirchhoff S, Schütz G & Krammer PH. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. (2005). *Blood.* **106**, 617-25.
11. Bernichtein S, Touraine P & Goffin V. New concepts in prolactin biology. (2010). *J Endocrinol.* **206**, 1-11.
12. Berwaer M, Martial JA & Davis JR. Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. (1994). *Mol Endocrinol.* **8**, 635-42.

13. Besedovsky HO & Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. (1996). *Endocr Rev.* **17**, 64–102.
14. Bevan MJ. In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. (1997). *Immunity*, **7**, 175-8.
15. Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT & Zuniga-Pflucker JC. Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. (2007). *Immunity*, **26**, 678-89.
16. Biswas R, Roy T & Chattopadhyay U. Prolactin induced reversal of glucocorticoid mediated apoptosis of immature cortical thymocytes is abrogated by induction of tumor. (2006). *J Neuroimmunol.* **171**.120-34.
17. Boehm T & Bleul CC. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. (2006). *Trends Immunol*, **27**, 477-84.
18. Boehm T, Scheu S, Pfeffer K & Bleul CC. Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. (2003). *J Exp Med*, **198**, 757-69.
19. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T & Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. (1995). *Immunity*. **3**, 87-98.
20. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. (1998). *Endocr Rev.* **19**, 225-68.
21. Bouchard B, Ormandy CJ, Di Santo JP & Kelly PA . Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. (1999). *J Immunol.* **163**, 576–82.
22. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, Adams JM & Strasser A. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. (1999). *Science.* **286**, 1735–38
23. Brandt J van den, Wang D & Reichardt HM. Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling. (2004) *Mol Endocrinol.* **18**, 687–95.
24. Brener Z, & Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. (1997). *Int Arch Allergy Immunol.* **114**, 103-10.
25. Buckland J. AIRE control in the thymus. (2003). *Nat Rev Immunol* . **3**, 847.
26. Carreño PC, Jiménez E, Sacedón R, Vicente A & Zapata AG. Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. (2004). *J Neuroimmunol.* **153**, 83-90.

27. Carreño PC, Sacedón R, Jiménez E, Vicente A & Zapata AG. Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. (2005). *J Neuroimmunol.* **160**, 135-45.
28. Chao DT, Linette GP, Boise LH, White LS, Thompson CB & Korsmeyer SJ. Bcl-xl and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. (1995). *J Exp Med.* **182**, 821-8.
29. Chatterjee-Kishore M, van den Akker F & Stark GR. Association of STATs with relatives and friends. (2000). *Trends Cell Biol.* **10**, 106-11.
30. Chavez-Rueda K, Hernández J, Zenteno E, Leaños-Miranda A, Legorreta-Haquet MV & Blanco-Favela F. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. (2005). *Clin Immunol.* **116**, 182-91.
31. Cole TJ, Myles K, Purton JF, Brereton PS, Solomon NM, Godfrey DI & Funder JW. GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant. (2001). *Mol Cell Endocrinol.* **173**, 193-202.
32. Corbacho AM, Valacchi G, Kubala L, Olano-Martín E, Schock BC, Kenny TP & Cross CE. Tissue-specific gene expression of prolactin receptor in the acute-phase response induced by lipopolysaccharides. (2004). *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **287**, 750-7.
33. Corrêa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Kenji Nihei O, Gruebler Y, Bozza M, Arzt E, Villa-Verde DM, Renner U, Stalla J, Stalla GK & Savino W. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. (2006). *J Neuroimmunol.* **173**, 12-22.
34. Corrêa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Renner U, Stalla J, Stalla GK & Savino W. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in *Trypanosoma cruzi*-infected mammosomatotrophic cells. (2009). *Neuroimmunomodulation.* **16**, 208-12.
35. Crivellato E, Vacca A & Ribatti D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. (2004). *Trends Immunol.* **25**, 210-7.
36. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR & Silva JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. (2010). *PLoS Negl Trop Dis.* **16**, 604.
37. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G & Riccardi C. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3- activated cell death. (1997). *Immunity.* **7**, 803-12.
38. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G & Riccardi C. A new dexamethasone-induced gene of the leucine

- zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. (1997). *Immunity*. **7**, 803-12.
39. Daneva T, Spinedi E, Hadid R & Gaillard RC. Impaired hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in Swiss nude athymic mice. (1995). *Neuroendocrinology*. **62**, 79–86.
40. Dardenne M, Savino W, Gagnerault MC, Itoh T & Bach JF. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. (1989). *Endocrinology*. **125**, 3-12.
41. De Mello-Coelho V, Villa-Verde DMS, Dardenne M & Savino W. Pituitary hormones modulate extracellular matrix-mediated interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. (1997). *J Neuroimmunol*. **76**, 39-49.
42. De Miguel F, Lee SO, Onate AS & Gao AC. Stat3 enhances transactivation of steroid hormone receptors. (2003). *Nucl Recept*. **1**,3.
43. Derbinski J & Kyewski B. Linking signalling pathways, thymic stroma integrity and autoimmunity. (2005). *Trends Immunol*. **26**, 503-6.
44. Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenahn M, Peltonen L, Walter J & Kyewski B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. (2005). *J Exp Med*, **202**, 33-45. Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G & Boyd R. Thymic generation and regeneration. (2003). *Immunol Rev*, **195**, 28-50.
45. Deroo BJ & Archer TK. Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin. (2001). *Mol Biol Cell*. **12**, 3365–74.
46. Dervović D & Zúñiga-Pflücker JC. Positive selection of T cells, an in vitro view. (2010). *Semin Immunol*. **22**, 276-86.
47. Dias JCP, Silveira AC & Schofield CJ. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America. (2002). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **97**, 603-12.
48. Doolan CM, O'Sullivan GC & Harvey BJ. Rapid effects of corticosteroids on cytosolic protein kinase C and intracellular calcium concentration in human distal colon. (1998). *Mol Cell Endocrinol*. **138**, 71-9.
49. Engblom D, Kornfeld JW, Schwake L, Tronche F, Reimann A, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R & Schütz G. Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. (2007). *Genes Dev*. **21**, 1157-62..
50. Forsthoefel AM & Thompson EA. Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cells. (1987). *Mol Endocrinol*. **1**, 899–907.



51. Gascoyne DM, Kypta RM & Vivanco MM. Glucocorticoids inhibit apoptosis during fibrosarcoma development by transcriptionally activating Bcl-xL. (2003). *J Biol Chem.* **278**, 18022–29.
52. Gaufo GO & Diamond MC. Prolactin increases CD4/CD8 cell ratio in thymus-grafted congenitally athymic nude mice. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:4165-9.
53. Gellersen B, Kempf R, Telgmann R & DiMattia GE. Pituitary-type transcription of the human prolactin gene in the absence of Pit-1. (1995). *Mol Endocrinol.* **9**, 887-901.
54. Grad JM, Zeng XR & Boise LH. Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. (2000). *Curr Opin Oncol.* **12**, 543-9.
55. Gudelsky GA, Nansel DD & Porter JC. Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. (1981). *Endocrinology.* **108**, 440-4.
56. Hakem A, Sasaki T, Kozieradzki I & Penninger JM. The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. (1999). *J Exp Med.* **189**, 957-68.
57. Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. (2001). *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 11318–23.
58. Hanson RW & Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. (1997). *Annu Rev Biochem.* **66**, 581–611.
59. Head GM, Mentlein R, Von Patay B, Downing JE & Kendall MD. Neuropeptides exert direct effects on rat thymic epithelial cells in culture. (1998). *Dev Immunol.* **6**, 95–104.
60. Heck S, Bender K, Kullmann M, Gottlicher M, Herrlich P & Cato AC. I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. (1997). *EMBO J.* **16**, 4698–707.
61. Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P & Cato AC. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. (1994). *EMBO J.* **13**, 4087–95.
62. Hiramane C, Nakagawa T, Miyauchi A & Hojo K. Thymic nurse cells as the site of thymocyte apoptosis and apoptotic cell clearance in the thymus of cyclophosphamide-treated mice. (1996). *Lab Invest.* **75**, 185-201.
63. Holtzman MJ, Green JM, Jayaraman S & Arch RH. Regulation of T cell apoptosis. (2000). *Apoptosis.* **5**, 459-71.
64. Hooghe R, Delhase M, Vergani P, Malur A & Hooghe-Peters EL. Growth hormone and prolactin are paracrine growth and differentiation factors in the haemopoietic system. (1993). *Immunol Today.* **14**, 212-4.

65. Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E & Dorshkind K. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. (1997) *EMBO J.* **16**, 6926–35.
66. Horseman ND. Prolactin receptor diversity in humans: novel isoforms suggest general principles. (2002). *Trends Endocrinol Metab.* **13**, 47-8.
67. Hosokawa Y, Yang M, Kaneko S, Tanaka M & Nakashima K. Prolactin induces switching of T cell receptor gene expression from a to g in rat NB2 pre-T lymphoma cells. (1996). *Biochem Biophys Res Commun.* **220**, 958–62.
68. Hsu YT, Wolter KG & Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**, 3668–72.
69. Huang ST & Cidlowski JA. Phosphorylation status modulates Bcl-2 function during glucocorticoid-induced apoptosis in T lymphocytes. (2002). *FASEB J.* **16**, 825–32.
70. Imai E, Miner JN, Mitchell JA, Yamamoto KR & Granner DK. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. (1993). *J Biol Chem.* **268**, 5353–56.
71. Jara LJ, Lavalle C, Fraga A, Gómez-Sánchez C, Silveira LH, Martínez-Osuna P, Germain BF & Espinoza LR. Prolactin, immunoregulation, and autoimmune diseases. (1991). *Semin Arthritis Rheum.* **20**, 273-84.
72. Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL & Zambetti GP. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. (2003) *Cancer Cell.* **4**, 321–28.
73. Jenkins BD, Pullen CB & Darimont BD. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. (2001). *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 122–26.
74. Jia L, Macey MG, Yin Y, Newland AC & Kelsey SM. Subcellular distribution and redistribution of Bcl-2 family proteins in human leukemia cells undergoing apoptosis. (1999). *Blood* **93**, 2353–59.
75. Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R & Borner C. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. (2003). *J Cell Biol.* **160**, 53–64.
76. Kaufmann T., Schlipf S., Sanz J., Neubert K., Stein R. & Borner C. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. (2003). *J Cell Biol.* **160**, 53–64.
77. Kierszenbaum F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? (2005). *Trends Parasitol.* **21**, 513-6.

78. Kline JB, Roehrs H & Clevenger CV. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. (1999) *J Biol Chem.* **274**, 35461-8.
79. Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND & Buckley AR. Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. (2003). *Endocrinology.* **144**, 2102-10.
80. Lechner O, Dietrich H, Wieggers GJ, Vacchio M & Wick G. Glucocorticoid production in the chicken bursa and thymus. (2001). *Int Immunol.* **13**, 769-76.
81. Lechner O, Wieggers G. J, Oliveira-Dos-Santos A. J, Dietrich H, Recheis H, Waterman M, Boyd R & Wick G. Glucocorticoid production in the murine thymus. (2000). *Eur J Immunol.* **30**, 337-46.
82. Leite de Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Leboulenger F, Savino W, Dardenne M & Lepault F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in Trypanosoma cruzi-infected mice: relationship to stress. (1991). *Scand J Immunol.* **33**, 267-75.
83. Lieberman ME, Maurer RA & Gorski J. Estrogen control of prolactin synthesis in vitro. (1978). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **75**, 5946-9.
84. Limbourg FP, Huang Z, Plumier JC, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schütz G, Moskowitz MA & Liao JK. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. (2002). *J Clin Invest.* **110**: 1729-38.
85. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR & Thompson CB. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. (2000). *Mol Cell.* **6**, 1389-99.
86. Long F, Wang Y, Qi HH, Zhou X & Jin XQ. Rapid non-genomic effects of glucocorticoids on oxidative stress in a guinea pig model of asthma. (2008). *Respirology.* **13**. 227-32.
87. Lu NZ & Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. (2005). *Mol Cell.* **18**, 331-42.
88. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR & Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. (1991). *Nature.* **352**, 497-505.
89. MacLeod RM & Lehmeyer JE. Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. (1974). *Endocrinology.* **94**, 1077-85.
90. Madden KS & Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. (1995). *Physiol Rev.* **75**, 77-106.

91. Majumder B, Biswas R & Chattopadhyay U. Prolactin regulates anti tumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. (2002). *Int J Cancer*. **97**, 493-500.
92. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P & Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. (1995). *Cell*. **83**, 835-39.
93. Mann CL, Hughes FM Jr & Cidlowski JA. Delineation of the signaling pathways involved in glucocorticoid-induced and spontaneous apoptosis of rat thymocytes. (2000). *Endocrinology*. **141**, 528-38.
94. Marinho CR, D'Império Lima MR, Grisotto MG & Alvarez JM. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. (1999). *Infect Immun*. **67**, 308-18.
95. Marsden VS & Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. (2003). *Annu. Rev Immunol*. **21**, 71-105.
96. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM & Strasser A. (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2 - regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature*. **419**, 634-37.
97. Mathis D & Benoist C. Yes, it does. (2007). *Nat Rev Immunol*, **7**, 1.
98. Matsuda NM, Miller SM & Evora PR. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. (2009). *Clinics*. **64**, 1219-24.
99. Medh RD, Webb MS, Miller AL, Johnson BH, Fofanov Y, Li T, Wood TG, Luxon BA & Thompson EB. Gene expression profile of human lymphoid CEM cells sensitive and resistant to glucocorticoid-evoked apoptosis. (2003). *Genomics*. **81**, 543-55.
100. Memon SA, Moreno MB, Petrak D & Zacharchuk CM. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. (1995). *J Immunol*. **155**, 4644-52.
101. Miller AH, Pariante CM & Pearce BD. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. (1999). *Adv Exp Med Biol*. **461**, 107-16.
102. Miller WL & Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. (1983). *Endocr Rev*. **4**, 97-130.
103. Mok CL, Gil-Gomez G, Williams O, Coles M, Taga S, Tolaini M, Norton T, Kioussis D & Brady HJ. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. (1999) *J Exp Med*. **189**, 575-86.

104. Moore NC, Anderson G, Williams GT, Owen JJ & Jenkinson EJ. Developmental regulation of bcl-2 expression in the thymus. (1994). *Immunology*. **81**, 115-9.
105. Murphy IJ, Tachibana K & Friesen HG. Stimulation of hepatic insulin-like growth factor-I gene expression by ovine prolactin: evidence for intrinsic somatogenic activity in the rat. (1998). *Endocrinology*. **122**, 2027–33.
106. Nagy E & Berczi I. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. (1991). *Endocrinology*. **128**, 2776-84.
107. Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY & Greenwood FC. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene duplication. (1971). *Proc Natl Acad Sci USA*. **68**, 866–70.
108. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K & Takahama Y. Thymic microenvironments for T cell repertoire formation. (2008). *Adv Immunol*. **99**, 59-94.
109. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G & Riccardi C. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**, 6216–21.
110. Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. (1994). *Cell*. **76**, 229–39.
111. Odaka C & Mizuochi T. Macrophages are involved in DNA degradation of apoptotic cells in murine thymus after administration of hydrocortisone. (2002). *Cell Death Differ*. **9**, 104-12.
112. Oldenburg NB, Evans-Storms RB, Cidlowski JA. In vivo resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in rat thymocytes with normal steroid receptor function in vitro. (1997). *Endocrinology*. **138**, 810-8.
113. Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. (2003). *Nat Rev Immunol*. **3**, 383-91.
114. Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C & Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. (1997). *Int J Cardiol*. **60**, 49-54.
115. Pazirandeh A, Xue Y, Rafter I, Sjøvall J, Jondal M & Okret S. Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. (1999). *FASEB J*. **13**, 893–901
116. Pazirandeh A, Jondal M & Okret S. Glucocorticoids delay age-associated thymic involution through directly affecting the thymocytes. (2004). *Endocrinology*. **145**, 2392-401.

117. Pazirandeh A, Jondal M, Okret S. Conditional expression of a glucocorticoid receptor transgene in thymocytes reveals a role for thymic-derived glucocorticoids in thymopoiesis in vivo. (2005). *Endocrinology*. **146**, 2501-7.
118. Pérez AR, Roggero E, Nicora A, Palazzi J, Besedovsky HO, Del Rey A & Bottasso OA. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. (2007). *Brain Behav Immun*. **21**, 890-900.
119. Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. (2003). *Nat Rev Immunol*, **3**, 859-66.
120. Pezet A, Favre H, Kelly PA & Ederly M. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. (1999). *J Biol Chem*. **274**, 24497-502.
121. Pratt WB, Gehring U & Toft DO. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. (1996). *EXS* .**11**, 79–89.
122. Pruett SB & Padgett EL. Thymus-derived glucocorticoids are insufficient for normal thymus homeostasis in the adult mouse. (2004). *BMC Immunol*. **2**, 5-24.
123. Purton J. F, Zhan Y, Liddicoat DR, Hardy CL, Lew A M, Cole TJ & Godfrey DI. Glucocorticoid receptor deficient thymic and peripheral T cells develop normally in adult mice. (2002) *Eur. J. Immunol*. **32**, 3546–55.
124. Purton JF, Boyd RL, Cole TJ & Godfrey DI. Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. (2000). *Immunity* .**13**, 179–86.
125. Qiao S, Chen L, Okret S & Jondal M. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. (2008). *Exp Cell Res*. **314**, 3027-35.
126. Reichardt H M, Umland T, Bauer A, Kretz O & Schütz G. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. (2000). *Mol Cell Biol*. **20**, 9009–17.
127. Reichardt HM, Kaestner K H, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O & Bock R. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. (1998). *Cell* . **93**, 531–41.
128. Robey EA, Fowlkes BJ & Pardoll DM. Molecular mechanisms for lineage commitment in T cell development. (1990). *Semin Immunol*. **2**, 25-34.
129. Roggero E, Pérez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Besedovsky HO, Bottasso OA & del Rey A. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. (2006). *J Endocrinol*. **190**, 495-503.

130. Rui H, Xu J, Mehta S, Fang H, Williams J, Dong F & Grimley PM. Activation of the Jak2-Stat5 signaling pathway in Nb2 lymphoma cells by an anti apoptotic agent, aurintricarboxylic acid. (1998). *J Biol Chem.* **273**, 28-32.
131. Rynikova A, Koppel J, Kuchar S, Cikos S & Mozes S. Effects of ovine prolactin in infant rats. (1998). *Exp Clin Endocrinol.* **92**, 241–44.
132. Sanden S, Tripmacher R, Weltrich R, Rohde W, Hiepe F, Burmester GR & Buttgereit F. Glucocorticoid dose dependent downregulation of glucocorticoid receptors in patients with rheumatic diseases. (2000). *J Rheumatol.* **27**, 1265-70.
133. Savino W & Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. (2000). *Endocr Rev*, **21**, 412-43.
134. Savino W & Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. (2000). *Endocr Rev.* **21**, 412-43.
135. Savino W, Ayres Martins S, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JS, Mendes-da-Cruz DA, Terra-Granado E, Kusmenok O & Villa-Verde DM. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? (2003). *Braz J Med Biol Res*, **36**, 1015-25.
136. Savino W, Dalmau SR & Dealmeida VC. Role of extracellular matrix-mediated interactions in thymocyte migration. (2000). *Dev Immunol.* **7**, 279-91.
137. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M & Cotta-de-Almeida V. Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? (2002). *Trends Immunol*, **23**, 305-13.
138. Savino W, Villa-Verde DMS, Alves LA & Dardenne M . Neuroendocrine control of the thymus. (1998). *Ann NY Acad Sci.* **840**, 470–79.
139. Savino W, Dardenne M, Velloso LA & Dayse Silva-Barbosa S. The thymus is a common target in malnutrition and infection. (2007). *Br J Nutr.* **98**.11-6.
140. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. (2006). *PLoS Pathog.* **2**, 62.
141. Schmid E, Schmid W, Jantzen M, Mayer D, Jastorff B & Schutz G. Transcription activation of the tyrosine aminotransferase gene by glucocorticoids and cAMP in primary hepatocytes. (1987). *Eur J Biochem.* **165**, 499–506.
142. Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL & Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. (2006). *Immunol Rev.* **212**, 60-73.
143. Shields DC, Harmon DL, Nunez F & Whitehead AS. The evolution of haematopoietic cytokine/receptor complexes. (1995). *Cytokine.* **7**, 679-88

144. Shuai K & Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. (2003). *Nat Rev Immunol.* **3**, 900-11.
145. Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y & Yefenof E. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. (2006). *J Exp Med.* **203**,189-201.
146. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C & Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. (1999). *Cell.* **98**, 181-91.
147. Speiser DE, Lees RK, Hengartner H, Zinkernagel RM & MacDonald HR. Positive and negative selection of T cell receptor V beta domains controlled by distinct cell populations in the thymus. (1989). *J Exp Med*, **170**, 2165-70.
148. Stimamiglio MA, Jiménez E, Silva-Barbosa SD, Alfaro D, García-Ceca JJ, Muñoz JJ, Cejalvo T, Savino W & Zapata A. EphB2-mediated interactions are essential for proper migration of T cell progenitors during fetal thymus colonization. (2010). *J Leukoc Biol.* **88**, 483-94.
149. Stoecklin E, Wissler M, Moriggl R & Groner B. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. (1997). *Mol Cell Biol.* **17**, 6708–16.
150. Stojić-Vukanić Z, Rauski A, Kosec D, Radojević K, Pilipović I & Leposavić G. Dysregulation of T-cell development in adrenal glucocorticoid-deprived rats. (2009). *Exp Biol Med.* **234**,1067-74.
151. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM & Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. (1999). *Nature.* **397**, 441–44.
152. Timsit J, Savino W, Safieh B, Chanson P, Gagnerault MC, Bach JF & Dardenne M. Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. (1992). *J Clin Endocrinol Metabol.* **75**,183–188.
153. Tonko M, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Helmberg A & Kofler R. Gene expression profiles of proliferating vs. G1/G0 arrested human leukemia cells suggest a mechanism for glucocorticoid-induced apoptosis. (2001). *FASEB J.* **15**, 693–99.
154. Tosa N, Murakami M, Jia WY, Yokoyama M, Masunaga T, Iwabuchi C, Inobe M, Iwabuchi K, Miyazaki T, Onoe K, Iwata M & Uede T. Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. (2003). *Int Immunol.* **15**, 741–49.
155. Triglia D & Rothenberg E. "Mature" thymocytes are not glucocorticoid-resistant in vitro. (1981). *J Immunol.* **127**, 64-8.



156. Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, Meco D, Petrangeli E, Frati L & Gulino A. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. (1992). *J Exp Med.* **175**, 637–46.
157. Vacchio MS, Lee JY & Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids set the thresholds for thymocyte selection by inhibiting TCR-mediated thymocyte activation. (1999). *J Immunol.* **163**, 1327-33.
158. Vacchio MS, Papadopoulos V & Ashwell JD. Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. (1994). *J Exp Med.* **179**, 1835–46.
159. van den Brandt J, Wang D & Reichardt HM. Resistance of single-positive thymocytes to glucocorticoid-induced apoptosis is mediated by CD28 signaling. (2003). *Mol Endocrinol.* **18**, 687-95.
160. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR & Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. (1993). *Cell.* **75**, 229–40.
161. Villa-Verde DMS, de Mello-Coelho V, Farias-de-Oliveira DA, Dardenne M & Savino W. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. (1993). *Endocrinology.* **133**, 867–75.
162. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM & Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. (2003). *Science.* **302**, 1036–38.
163. Vishwa Dixit V, Youm Y, Yang H, Venkov C, Manley N, Nielson E, Leff T & Vandanmagsar B. Origin of Thymic Adipocytes in Aging: Incidental to Thymopoiesis or Instigator of Immunosenescence? (2010). *J Immunol.* **184**, 132.
164. von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, Jaeckel E, Grassi F & Klein L. Thymic selection revisited: how essential is it? (2003). *Immunol Rev.* **191**, 62-78.
165. von Boehmer H. Selection of the T-cell repertoire: receptor-controlled checkpoints in T-cell development. (2004). *Adv Immunol.* **84**, 201-38.
166. Wang Z, Malone MH, He H, McColl KS & Distelhorst CW. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. (2003b). *J Biol Chem.* **278**, 23861–67.
167. Wang Z, Malone MH, Thomenius MJ, Zhong F, Xu F & Distelhorst CW. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. (2003a). *J Biol Chem.* **278**, 27053–58.

168. Webster JI, Tonelli L & Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. (2002) *Annu Rev Immunol.* **20**,125–63.
169. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ & Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. (2001) *Science.* **292**, 727–73.
170. Weimann E, Baixeras E, Zamzami N & Kelly P. Prolactin blocks glucocorticoid induced cell death by inhibiting the disruption of the mitochondrial membrane. (1999). *Leuk Res.* **23**, 751-62.
171. Wells JÁ & De Vos AM. Hematopoietic receptor complexes.(1996). *Annu Rev Biochem.* **65**, 609–34.
172. Wensky A, Marcondes MC & Lafaille JJ. The role of IFN-gamma in the production of Th2 subpopulations: implications for variable Th2-mediated pathologies in autoimmunity. (2001). *J Immunol.* **167**, 3074-81.
173. Wiegers GJ, Knoflach M, Böck G, Niederegger H, Dietrich H, Falus A, Boyd R & Wick G. CD4(+)CD8(+)TCR(low) thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. (2001). *Eur J Immunol.* **31**, 2293-301.
174. Wu L & Strasser A. "Decisions, decisions.": beta-catenin-mediated activation of TCF-1 and Lef-1 influences the fate of developing T cells. (2001). *Nat Immunol.* **2**, 823-4.
175. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA & Korsmeyer SJ. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. (1999). *Nature.* **400**, 886–91.
176. Yin XM. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. (2000) *J Mol Med.* **78**, 203–11.
177. Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. (2002). *Recent Prog Horm Res.* **57**, 435-55.
178. Zhan Y, Funda DP, Every AL, Fundova P, Purton JF, Liddicoat DR, Cole TJ, Godfrey DI, Brady JL, Mannering SI, Harrison LC & Lew AM. TCR-mediated activation promotes GITR upregulation in T cells and resistance to glucocorticoid-induced death. (2004). *Int Immunol.* **16**,1315-21.
179. Zhang N, Hartig H, Dzhalgalov I, Draper D & He YW. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. (2005). *Cell Res.* **15**, 749-69.
180. Zhou J & Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. (2005). *Steroids.* **70**, 407–17.