

**LUIS NATIVIDAD NUÑEZ APAZA**

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA, FUNCIONAL E DOS  
REQUERIMENTOS PARA A GERAÇÃO DOS  
LINFOCITOS TCD8<sup>LOW</sup>CD45RC<sup>LOW</sup> NO CAMUNDONGO  
CRÔNICAMENTE INFETADO COM *Trypanosoma cruzi***

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

**SÃO PAULO**

**2008**

**LUIS NATIVIDAD NUÑEZ APAZA**

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA, FUNCIONAL E DOS  
REQUERIMENTOS PARA A GERAÇÃO DOS  
LINFOCITOS TCD8<sup>LOW</sup>CD45RC<sup>LOW</sup> NO CAMUNDONGO  
CRÔNICAMENTE INFETADO COM *Trypanosoma cruzi***

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

Orientador: Prof. Dr. José Maria A. Mosig

**SÃO PAULO**

**2008**

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

© reprodução total

Nuñez-Apaza, Luis Natividad.

Avaliação fenotípica funcional e dos requerimentos para a geração dos linfócitos T CD8<sup>low</sup> CD45RC<sup>low</sup> no camundongo com infecção crônica por *Trypanosoma cruzi* / Luis Natividad Nuñez-Apaza. -- São Paulo, 2008.

Orientador: José Maria Alvarez Mosig.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia das Parasitoses.

Versão do título para o inglês: Phenotypic, functional evaluation and of the request for the generation of the linfocitos T CD8<sup>low</sup> CD45RC<sup>low</sup> in the mice chronic intected with *Trypanosoma cruzi*.

Descritores: 1. *Trypanosoma cruzi* 2. CD8 3. Doença de Chagas  
I. Mosig, Jose Maria Alvarez II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pos-Graduação em Imunologia.  
III. Título.

ICB/SBIB214/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Luis Natividad Nuñez-Apaza.

Título da Tese: Avaliação fenotípica funcional e dos requerimentos para a geração dos linfócitos T CD8<sup>low</sup> CD45RC<sup>low</sup> no camundongo com infecção crônica por *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): José Maria Alvarez Mosig.

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

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

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

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

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

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

A Margarita .(Avo)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor e amigo José Maria A. Mosig, pela orientação e incentivo durante todos estes anos de trabalho.

A Maria Regina D'Império Lima, pelo acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

As professoras Isses de Almeida Abrahamson, Karina Bastos e Nancy Starobynas, pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

A Rogério e Meiri pelo apoio técnico de laboratório.

À amiga Jovelina, pelo cuidadoso trabalho de revisão deste manuscrito.

Aos amigos do laboratório.

Aos amigos do Departamento de imunologia.

E a todos aqueles que foram importantes nesta fase e que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

## RESUMO

NUÑEZ-APAZA, L. N. **Avaliação fenotípica, funcional e dos requerimentos para a geração dos linfócitos TCD8<sup>LOW</sup> CD45RC<sup>LOW</sup> no camundongo cronicamente infectado com *Trypanosoma cruzi*.** 124 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O controle do parasita na fase crônica da infecção por *Trypanosoma cruzi* se dá principalmente por uma resposta mediada por anticorpos, uma resposta celular TH1 e uma resposta mediada por linfócitos T CD8. Na fase crônica, co-existem linfócitos T CD8 com fenótipo CD8<sup>Low</sup> CD45RC<sup>Low</sup> (CD8LL que apresentam marcadores de células sensibilizadas pelo antígeno) junto com células CD8<sup>High</sup> CD45RC<sup>High</sup> (CD8HH, que em grande parte apresentam fenótipo de célula naive). Células CD8<sup>High</sup> CD45RC<sup>Low</sup> (CD8HL) podem ser também observadas. As células CD8LL se apresentam no camundongo independente da cepa de *T. cruzi* infectante. Verificou-se que na sua grande maioria as células CD8LL tem fenótipo de células em repouso, baixa expressão de CD62L baixa expressão de CD127 (CD62L<sup>LOW</sup>CD127<sup>LOW</sup>), sendo estas as características de células efectoras de memória (EM). Este tipo celular ainda pode chegar a expressar marcadores de células NK de significado incerto. Observa-se, na análise funcional, que na estimulação *in vitro* das células CD8 com anticorpos anti-CD3/CD28 há uma recuperação baixa de CD8 por provável morte por AICD. Este fato é reforçado pelo aumento da ligação à anexina nas células sobreviventes, bem como através da expressão de CD69. Estudos anteriores relataram que o número de células CD8 diminuía após desafio *in vivo* com o parasita; porém o observado foi uma diminuição das células CD8LL na estimulação inespecífica *in vivo* com Poli-IC, um ligante de TLR-3. O desafio *in vivo* com antígeno de tripanossoma na cavidade pleural ocasiona uma migração preferencial de células CD8 e entre estas migram células de fenótipos CD8LL e CD8HL. No entanto, ao contrário do

esperado, este estímulo resulta em uma diminuição da expressão de CD69 nas células CD8 infiltrantes. Visando determinar *in vivo* o papel protetor das células CD8, em um primeiro momento células de baço total foram transferidas para camundongos saudáveis e, após a infecção com *T. cruzi*, observou-se um controle parcial da infecção, caracterizado por um retardo no pico de parasitemia e diminuição na intensidade de infecção, evidenciando um papel protetor parcial *in vivo*. Na determinação de fatores envolvidos na geração e manutenção das células CD8LL, observou-se que os camundongos deficientes em CD28, INOS ou CD4 têm geração normal de células CD8LL. Os camundongos IL-12p40-KO têm uma deficiência parcial na geração de células CD8LL. Já os camundongos deficientes em INF-gama, por sua vez, possuem uma deficiência acentuada destas células, apesar de que a diminuição poderia se dever a um aumento da necessidade periférica. Por outro lado, os camundongos IL-12p40-KO e INF-gama-KO desenvolvem um quadro neurológico sub-agudo progressivo, onde as células CD8 infiltrantes na medula espinhal apresentam um fenótipo misto CD8LL e CD8HL, e não são anérgicas, por sinal.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Chagas; Linfócito TCD8.



## ABSTRACT

NUÑEZ-APAZA, L. N. **Phenotypic evaluation, and functional requirements for the generation of lymphocytes TCD8<sup>LOW</sup> CD45RC<sup>LOW</sup> in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*.** 124 f. Thesis (Ph.D.)-Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2008.

The control of the parasite in the chronic phase of infection by *Trypanosoma cruzi* occurs mainly by an antibody response mediated by a TH1 response and a cellular response mediated by CD8 T lymphocytes. In the chronic phase, co-exist with CD8 T lymphocyte phenotype CD8<sup>Low</sup> CD45RC<sup>Low</sup> (CD8LL showing markers of cells sensitized by antigen) with cell CD8<sup>High</sup> CD45RC<sup>High</sup> (CD8HH which have largely naive cell phenotype). Cells CD8<sup>High</sup> CD45RC<sup>Low</sup> (CD8HL) can also be observed. CD8LL cells were present in mice independent of the strain of *T. cruzi* infecting. It was found that in most cells CD8LL cell phenotype is at rest, low expression of CD62L low expression of CD127 (CD62L<sup>LOW</sup>CD127<sup>LOW</sup>), which are the characteristics of effector memory cells (MS). This cell type can still get to express markers of NK cells of uncertain significance. There is, in functional analysis, which in in vitro stimulation of CD8 cells with anti-CD3/CD28 antibodies there is a low recovery of CD8 by probable death IACD. This fact is reinforced by the increase in connection anexina cells survived, and through the expression of CD69. Previous studies reported that the number of CD8 cells decreased after in vivo challenge with the parasite, but the observed was a decrease in cell CD8LL the nonspecific stimulation in vivo with poly-IC, a ligand of TLR-3. The challenge with antigen in vivo of trypanosome in the pleural cavity causes a preferential migration of CD8 cells and between the migrating cells CD8LL phenotypes and CD8HL. However, unlike the expected, this stimulation results in a decrease in the expression of CD69 on CD8 cells infiltrating. To determine the in vivo protective role of CD8 cells in a first time total spleen cells were transferred to healthy mice and after infection with *T. cruzi*, there was a partial control of infection,

characterized by a delay in peak parasitemia and decrease in intensity of infection, indicating a partial protective role in vivo. In determining the factors involved in the generation and maintenance of cells CD8LL, it was observed that mice deficient in CD28, iNOS and generation have normal CD4 cell CD8LL. The mouse IL-12p40-KO have a partial deficiency in the generation of cells CD8LL. But the mice deficient in INF-gamma, which in turn have a marked deficiency of these cells, although the decrease could be due to increased peripheral need. Moreover, the mice IL-12p40-KO and INF-gamma-KO develop a progressive neurological sub-acute, where the infiltrating CD8 cells in the spinal cord showed a mixed phenotype CD8LL and CD8HL, and are not anergic, by signal.

Keywords: Trypanosoma cruzi, Chagas; TCD8 lymphocytes.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

